

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie

Arbeit angefertigt unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Hermann Ammer

Angefertigt am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Albert-
Ludwigs-Universität Freiburg

Mentor: Herr Prof. Dr. Dr. Klaus Aktories

Untersuchungen zur Bildung zellulärer Protrusionen durch die *Clostridium difficile*-Transferase CDT

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Thilo Nölke

aus Herdecke

München 2015

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Hermann Ammer

Korreferenten: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger
Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin P. Märtlbauer
Priv.-Doz. Dr. Sven Reese
Univ.-Prof. Dr. Walter Hermanns

Tag der Promotion: 31. Januar 2015

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
2.	LITERATURÜBERSICHT	2
2.1.	Clostridien	2
2.1.1.	<i>Clostridium difficile</i>	2
2.2.	Toxine von <i>Clostridium difficile</i>	3
2.2.1.	Die <i>Clostridium difficile</i> -Transferase CDT	4
2.2.1.1.	Die ADP-Ribosylierung	5
2.2.1.2.	Aufbau von CDT	8
2.2.1.3.	Bindung und Aufnahme von CDT	10
2.2.1.4.	Toxizität und zelluläre Effekte von CDT	13
2.3.	Das Zytoskelett	16
2.3.1.	Das Aktinzytoskelett	16
2.3.1.1.	Regulation des Aktinzytoskeletts	17
2.3.2.	Das Mikrotubulizytoskelett	18
2.3.2.1.	Regulation des Mikrotubulizytoskeletts	19
2.3.3.	Das Septinzytoskelett	20
2.3.3.1.	Regulation des Septinzytoskeletts	22
2.3.4.	Intermediärfilamente	25
2.4.	Die Plasmamembran	25
2.4.1.	Verschiedene Lipide der Plasmamembran	26
2.4.2.	Cholesterol	27
2.4.3.	Das Modell der <i>lipid rafts</i>	27
3.	MATERIAL UND METHODEN	29
3.1.	Material	29
3.1.1.	Bakterienstämme und Nährlösungen	29
3.1.1.1.	<i>E. coli</i> -Stämme zur Expression und Amplifizierung von Plasmid-DNA	29
3.1.1.2.	<i>B. megaterium</i> -Stamm zur Expression von Plasmid-DNA	29
3.1.1.3.	Nährlösungen	29
3.1.1.4.	Antibiotika zur Bakterienkultivierung	30
3.1.1.5.	Selektivnährböden	30

3.1.2.	Humane Zelllinien und Kulturmedien	30
3.1.2.1.	Humane Zelllinien	30
3.1.2.2.	Zellkulturmedien und Lösungen	31
3.1.3.	Vektoren	32
3.1.3.1.	Vektoren zur Genexpression in Bakterien	32
3.1.3.2.	Vektoren zur Genexpression in humanen Zelllinien	32
3.1.3.3.	Sonstige Vektoren	32
3.1.4.	Plasmide	33
3.1.5.	Oligonukleotide	34
3.1.6.	Antikörper	35
3.1.7.	Chemikalien und Substanzen	36
3.1.7.1.	Lösungen und Puffer	36
3.1.7.2.	Enzyme	44
3.1.7.3.	DNA- und Proteinstandards	45
3.1.7.4.	Radionuklide	45
3.1.7.5.	Fluorophor-Konjugate	45
3.1.7.6.	Kits	45
3.1.7.7.	Sonstige Chemikalien und Materialien	46
3.2.	Methoden	47
3.2.1.	Molekularbiologische Methoden	47
3.2.1.1.	Agarosegelelektrophorese	47
3.2.1.2.	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	47
3.2.1.3.	Polymerase-Kettenreaktion	47
3.2.1.4.	Aufreinigung von PCR-Produkten	48
3.2.1.5.	Konzentrationsbestimmung von DNA	48
3.2.1.6.	Präparation von Plasmid-DNA	49
3.2.1.7.	Ligation von DNA-Fragmenten	49
3.2.1.8.	Transformation von <i>E. coli</i> -Bakterien	49
3.2.1.9.	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien	50
3.2.1.10.	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	50
3.2.1.11.	Klonierung von DNA-Fragmenten in Expressionsvektoren	50
3.2.1.12.	Direkte Klonierung von PCR-Produkten	51
3.2.1.13.	Klonierung von shRNA-Konstrukten	51
3.2.1.14.	DNA-Sequenzierung	51

3.2.2.	Proteinbiochemische Methoden	51
3.2.2.1.	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	51
3.2.2.2.	Aufreinigung von 6xHistidin-Fusionsproteinen	53
3.2.2.3.	Trypsinaktivierung von C2II und CDTb	54
3.2.2.4.	Herstellung GST-Fusionsprotein-beladener Sepharosebeads	55
3.2.2.5.	Bestimmung der Konzentration von Proteinlösungen	55
3.2.2.6.	Umpuffern von Proteinlösungen	55
3.2.2.7.	Markierung von CDTa und CDTb mit Maleimid Alexa 568	56
3.2.2.8.	ADP-Nachribosylierung und in vitro-ADP-Ribosylierung	56
3.2.2.9.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	57
3.2.2.10.	Coomassie-Färbung von Acrylamidgelen	58
3.2.2.11.	Western-Blot	58
3.2.2.12.	Immunodetektion	58
3.2.2.13.	Ponceau-Färbung	59
3.2.2.14.	Pulldown-Experimente	59
3.2.2.15.	Mikrotubuli-Spindown-Experimente	60
3.2.2.16.	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie	60
3.2.3.	Zellbiologische Methoden	62
3.2.3.1.	Kultivieren und Passagieren verwendeter humaner Zelllinien	62
3.2.3.2.	Transfektion humaner Zelllinien	62
3.2.3.3.	Herstellung von Zelllysaten	63
3.2.3.4.	Fluoreszenzzytologische Methoden	63
3.2.3.5.	Fluoreszenzmikroskopie	64
3.2.3.6.	Lebendzellmikroskopie	65
3.2.3.7.	Quantifizierung der Ausläuferbildung	65
3.2.3.8.	Mikroinjektion	65
3.2.3.9.	Manipulation der Plasmamembranzusammensetzung von Caco-2-Zellen	66
3.2.3.10.	Zellviabilitäts-Untersuchungen	67
3.2.3.11.	Behandlung von Caco-2-Zellen mit Forchlorfenuron	67
3.2.3.12.	<i>Fluorescence activated cell sorting</i> (FACS)	67
3.2.3.13.	Statistische Methoden	68

4.	ERGEBNISSE	69
4.1.	Untersuchungen zum Einfluss der Plasmamembran- zusammensetzung auf die CDT-induzierte Ausläuferbildung	69
4.1.1.	CDT induziert Zellausläufer in Caco-2-Zellen durch Aktin-ADP-Ribosylierung	69
4.1.2.	Einfluss der Cholesteroldepletion auf die Ausläuferbildung	71
4.1.3.	Einfluss der Cholesterolrepletion auf die Ausläuferbildung	74
4.1.4.	Einfluss der Cholesterolmanipulation auf das Mikrotubuli- und Aktinzytoskelett	76
4.1.5.	Einfluss von Methyl- β -Cyclodextrin auf die Aufnahme und Aktivität von CDT	80
4.1.6.	Störung der Membrankonstitution durch Sphingomyelinase, Myriocin, Nystatin und Benzylalkohol	82
4.1.7.	Untersuchungen zur Zytotoxizität der verwendeten Substanzen	85
4.1.8.	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur Lokalisation von <i>lipid raft</i> -Markern	87
4.2.	Untersuchungen zur Beteiligung des Septinzytoskeletts an der CDT-induzierten Ausläuferbildung	90
4.2.1.	Der Einfluss von CDT auf die Organisation des Septinzytoskeletts	90
4.2.2.	Die Lokalisation von Septinfilamenten an der Basis CDT-induzierter Ausläufer	90
4.2.3.	Die Lokalisation von Septinen bei der Ausläuferbildung	99
4.2.4.	Einfluss von Forchlorfenuron auf die Ausläuferbildung	101
4.2.5.	Einfluss der Überexpression einzelner Septine auf die Ausläuferbildung	109
4.2.6.	Einfluss der Herunterregulation einzelner Septine auf die Ausläuferbildung	112
4.2.7.	Untersuchungen zur Interaktion von Septinen mit Mikrotubuli und EB1	115
4.2.8.	F-Aktin-Unabhängigkeit der CDT-induzierten Ausläuferbildung	119
5.	DISKUSSION	123
5.1.	Untersuchungen zum Einfluss der Plasmamembran- zusammensetzung auf die CDT-induzierte Ausläuferbildung	123
5.1.1.	CDT induziert Mikrotubuli-basierte zelluläre Ausläufer durch Aktin-ADP-Ribosylierung	123

5.1.2.	Die Cholesteroldepletion der Plasmamembran hemmt die Bildung CDT-induzierter Zellausläufer	124
5.1.3.	Die Cholesteroldepletion hat keinen maßgeblichen Einfluss auf die CDT-Aktivität und die Aufnahme von CDT	125
5.1.4.	Substanzen, die die Bildung und das Gefüge von <i>lipid rafts</i> stören, hemmen die Bildung CDT-induzierter Zellausläufer	126
5.1.5.	Untersuchungen zur zytotoxischen Wirkung der verwendeten Substanzen	127
5.1.6.	Anreicherung von <i>lipid raft</i> -Markern an Stellen der CDT-induzierten Ausläuferbildung	128
5.2.	Die Rolle des Septinzytoskeletts bei der Bildung CDT-induzierter Zellausläufer	130
5.2.1.	Die Lokalisation spezifischer Septinstrukturen an der Basis CDT-induzierter Zellausläufer	130
5.2.2.	CDT-induzierte Zellausläufer bilden sich an Stellen der Plasmamembran, an denen sich Septinakkumulationen befinden	131
5.2.3.	Forchlorfenuron hemmt die Bildung CDT-induzierter Zellausläufer	133
5.2.4.	Die Septine 6 und 7 haben eine essenzielle Funktion für die Bildung CDT-induzierter Zellausläufer	135
5.2.5.	Untersuchungen zur Interaktion von Septinen mit Mikrotubuli und EB1	137
5.2.6.	F-Aktin-Unabhängigkeit der CDT-induzierten Ausläuferbildung	139
6.	ZUSAMMENFASSUNG	142
7.	SUMMARY	144
8.	LITERATURVERZEICHNIS	146
9.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	163
10.	ANHANG	166
11.	LEBENS LAUF	169
12.	DANKSAGUNG	170

1. EINLEITUNG

Clostridium difficile stellt den Haupterreger von Antibiotika-assoziierten Durchfällen beim Menschen dar. Schwere Verläufe der Infektion können zu fibrinös-nekrotisierenden Entzündungen des Kolons führen, die oft lebensbedrohlich verlaufen (Kelly and LaMont, 2008). Vergleichbare Infektionsverläufe finden sich auch bei Haussäugetieren, hier stellen die Erkrankungen von Ferkeln die bedeutendsten *C. difficile*-Infektionen dar. Auch humanpathogene *C. difficile*-Stämme werden regelmäßig aus erkrankten Tieren isoliert (Keel *et al.*, 2007; Goorhuis *et al.*, 2008; Keel and Songer, 2006). Als wichtigste Virulenzfaktoren von *C. difficile* gelten die clostridialen glukosylierenden Toxine A und B, welche GTPasen der Rho-Familie in den Wirtszellen inaktivieren (Just *et al.*, 1995). Das einzig weiterhin bekannte Toxin von *C. difficile* ist die ursprünglich aus dem hypervirulenten Stamm CD196 isolierte *Clostridium difficile*-Transferase (CDT) (Popoff *et al.*, 1988; Perelle *et al.*, 1997). CDT ist ein binäres Aktin-ADP-ribosylierendes Toxin, das die Depolymerisation des Aktinzytoskeletts in Zielzellen durch die Übertragung eines ADP-Riboserests auf G-Aktin bewirkt (Gerding *et al.*, 2014). Infolgedessen induziert CDT die Bildung Mikrotubuli-basierter Zellausläufer. Untersuchungen zur Funktion dieser Ausläufer zeigten, dass sie ein dichtes Netzwerk auf der Zelloberfläche bilden, in dem sich die Clostridien verfangen. Dies führt zu einer vermehrten Adhäsion von *C. difficile* an intestinale Epithelzellen und einer erhöhten Kolonisation des Darms durch die Bakterien (Schwan *et al.*, 2009).

In der vorliegenden Arbeit werden die zellbiologischen Vorgänge, die zu der Bildung von CDT-induzierten Zellausläufern führen, näher untersucht. Die Untersuchungen konzentrieren sich hierbei auf die Rolle der Plasmamembranzusammensetzung und des Septinzytoskeletts bei der Toxin-induzierten Ausläuferbildung. Dies kann bisheriges Wissen über generelle Prozesse der zellulären Ausläuferbildung erweitern sowie nähere Erkenntnisse über diesen speziellen Typ von Zellausläufer liefern. Ferner trägt diese Arbeit zum weiteren Verständnis der Wirkung von CDT auf das Zytoskelett bei, was neue Einblicke in das Zusammenspiel der einzelnen zytoskelettalen Komponenten erlaubt. Zusätzlich wird der Mechanismus dieser neuartigen Wirt-Pathogen-Interaktion näher aufgeklärt und das medizinische Wissen über die zyto- und molekular-pathologischen Vorgänge bei einer *C. difficile*-Infektion vergrößert.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1. Clostridien

Clostridien sind eine Bakteriengattung der Familie der Clostridiaceae. Es handelt sich um gram-positive und obligat anaerobe stäbchenförmige Bakterien, die den Darm von Menschen und Tieren besiedeln sowie in Böden und Abwässern vorkommen (Cato *et al.*, 1986). Die Gattung beinhaltet einige pathogene Spezies, die Auslöser verschiedener Erkrankungen von Mensch und Tier sind. Zu diesen Erkrankungen gehören der Botulismus, Wundstarrkrampf, Rauschbrand und verschiedene Durchfallerkrankungen. Clostridien bilden unter aeroben Umweltbedingungen hitze- sowie sauerstoffresistente Dauerformen aus, sogenannte Endosporen (Hatheway, 1990). Diese sind über Jahrzehnte hinweg umweltstabil und stellen die häufigste Infektionsform der Clostridien dar. Eine wichtige medizinische Rolle in der entwickelten Welt spielen die von *Clostridium difficile* verursachten Darmerkrankungen des Menschen. Hierzu zählen bei mildereren Infektionsverläufen leichte bis schwere Durchfälle, schwerwiegendere Verläufe der Infektion verursachen fibrinös-nekrotisierende Entzündungen des Kolons. Diese zeichnen sich durch charakteristische Plaque-artige fibrinöse Beläge der Darmschleimhaut aus. Am häufigsten entwickelt sich dieses Krankheitsbild nach nosokomialen Infektionen in Verbindung mit Antibiotikagaben (Kelly *et al.*, 1994).

2.1.1. *Clostridium difficile*

Im Jahr 1935 wurde *Clostridium difficile* erstmalig beschrieben (Hall and O'Toole, 1935). Das damals noch als *Bacillus difficile* bezeichnete Bakterium wurde aus dem Stuhl von asymptomatischen Säuglingen isoliert und als Teil der natürlichen Darmflora angesehen. Es erhielt seine bis heute beibehaltene Speziesbezeichnung aufgrund seiner schweren Kultivierbarkeit (lat. für schwer, schwierig). Das erste Mal im Zusammenhang mit einer Erkrankung wurde *C. difficile* 1978 beschrieben, hier wurde es als Erreger Antibiotika-assoziiierter Durchfälle identifiziert (Bartlett *et al.*, 1978). Heutzutage stellt *C. difficile* einen der bedeutendsten Erreger nosokomialer Darminfektionen dar (Kelly and LaMont, 2008). Ausgelöst wird die Erkrankung meist durch eine von Antibiotikagaben verursachte Dysbakterie, welche die Vermehrung pathogener *C. difficile*-Stämme im Darm begünstigt. Neben mildereren Verläufen der Erkrankung, bei denen die Durchfälle nach der Antibiotikagabe rasch abklingen, treten auch fibrinös-nekrotisierende Entzündungen des Kolons auf, die oft lebensbedrohlich verlaufen (Kelly *et al.*, 1994).

Seit gut zehn Jahren zeigen sich epidemiologische Veränderungen der *C. difficile*-Infektionen beim Menschen (Dawson *et al.*, 2009), die durch eine gehäufte Inzidenz und Letalität gekennzeichnet sind. Diese Entwicklung wird mit dem Auftreten hypervirulenter *C. difficile*-Stämme in Verbindung gebracht (McDonald *et al.*, 2005). Auch veterinärmedizinisch spielen *C. difficile*-Infektionen des Gastrointestinaltrakts eine zunehmende Rolle, wo sie ebenfalls zu schweren pathologischen Veränderungen des Darms führen können (Keel and Songer, 2006). Bei den meisten Haussäugetieren zeigen sich vorrangig Veränderungen des Dick- und Blinddarms, bei Kaninchen und Fohlen treten überwiegend Dünndarmläsionen auf. Besonders bei Ferkeln gilt *C. difficile* als einer der bedeutendsten Durchfallerreger mit einer Zunahme der Fallzahlen über die letzten Jahre (Songer and Anderson, 2006; Songer, 2004; Yaeger *et al.*, 2002). Viele humanpathogene *C. difficile*-Stämme, auch der hypervirulente Stamm Ribotyp 078, wurden in verschiedenen Fällen aus unterschiedlichen Tierarten isoliert, insbesondere aus lebensmittelliefernden Arten wie Schweinen und Rindern (Keel *et al.*, 2007; Goorhuis *et al.*, 2008). Aufgrund dieser Beobachtungen geht man von einer Übertragung pathogener Stämme zwischen Mensch und Tier aus (Keessen *et al.*, 2011). Aus Begleittieren können ebenfalls humanpathogene *C. difficile*-Stämme isoliert werden, diese Tiere sind meist asymptomatische Träger der Bakterien (Keel and Songer, 2006).

2.2. Toxine von *Clostridium difficile*

Hauptverantwortlich für die Pathogenität von *C. difficile* werden die beiden clostridialen glukosylierenden Toxine (CGT) Toxin A (TcdA) und Toxin B (TcdB) gemacht (Kelly and LaMont, 2008). Diese sind 310 kDa (TcdA) bzw. 270 kDa (TcdB) schwere Proteintoxine, die in der Zielzelle zur Glukosylierung von Rho-GTPasen führen und diese dadurch inaktivieren. Hierbei transferieren die Toxine ein Glukosemolekül vom Cosubstrat UDP-Glukose auf ein Threonin, wodurch die GTPasen nicht mehr mit anderen Signalmolekülen, sogenannten Effektoren, interagieren können. Dadurch werden die Signalwege der Rho-GTPasen in den Zielzellen blockiert (Aktories and Just, 1995). Rho-GTPasen sind die Hauptregulatoren des Aktinzytoskeletts und dessen Polymerisation (Hall, 1998), sodass eine Inaktivierung zum Zusammenbruch des Aktinzytoskeletts und zum Untergang der Zielzelle führt. Überwiegend hypervirulente *C. difficile*-Stämme produzieren ein weiteres Toxin, die *Clostridium difficile*-Transferase (CDT) (Bacci *et al.*, 2011; McDonald *et al.*, 2005).

CDT wurde zuerst 1988 in dem *C. difficile*-Stamm CD196 beschrieben und 1997 erstmalig kloniert und charakterisiert (Popoff *et al.*, 1988; Perelle *et al.*, 1997). Bei CDT handelt es sich um ein binäres clostridiales Aktin-ADP-ribosylierendes Toxin, das die Übertragung eines ADP-Riboserests vom Cosubstrat Nicotinamidadenindinukleotid auf monomeres Aktin (G-Aktin) katalysiert. Zusätzlich sind hypervirulente *C. difficile*-Stämme durch eine vermehrte Toxinproduktion von TcdA und TcdB charakterisiert. Hierfür sind Deletionsmutationen im regulierenden TcdC-Gen des Pathogenitätslokus verantwortlich. Außerdem weisen hypervirulente *C. difficile*-Stämme eine Resistenz gegenüber Fluorchinolon-Antibiotika auf (Kelly and LaMont, 2008; McDonald *et al.*, 2005). Alle bekannten *C. difficile*-Toxine zielen auf die Zerstörung des Aktinzytoskeletts ihrer Zielzellen ab. Die beiden Rho-GTPasen glukosylierenden Toxine TcdA und TcdB wirken indirekt auf Aktin, während die ADP-Ribosylierung von G-Aktin durch CDT direkt zur Aktindepolymerisation führt.

2.2.1. Die *Clostridium difficile*-Transferase CDT

CDT ist ein binäres Toxin. Das bedeutet, es besteht aus zwei separat produzierten und sezernierten Proteinen, CDTa und CDTb. CDTa ist die enzymatisch aktive Komponente, während CDTb die Bindung des Toxins an die Zielzelle und die Translokation der enzymatischen Komponente ins Zytosol vermittelt (Gerding *et al.*, 2014). Aufgrund von Sequenzhomologien und der Austauschbarkeit der einzelnen Komponenten innerhalb dieser Toxinfamilie lässt sich CDT der Familie der Iota-Toxin ähnlichen Toxine zuordnen (Barth *et al.*, 2004). Hierzu gehören auch das namensgebende Iota-Toxin von *Clostridium perfringens* (Stiles and Wilkins, 1986) und die *Clostridium spiroforme*-Transferase (CST) von *Clostridium spiroforme* (Simpson *et al.*, 1989). Die Mitglieder der Iota-Toxin-Familie nutzen den gemeinsamen Wirtszellrezeptor *lipolysis stimulated lipoprotein receptor* (LSR) für die Aufnahme in die Zielzelle (Papatheodorou *et al.*, 2012; Papatheodorou *et al.*, 2011). Ein weiteres clostridiales binäres Aktin-ADP-ribosylierendes Toxin ist das C2-Toxin von *Clostridium botulinum* (Ohishi *et al.*, 1980), welches sich dieser Familie nicht zuordnen lässt und LSR nicht als Wirtszellrezeptor verwendet. Sie alle modifizieren G-Aktin, indem sie den Transfer eines ADP-Riboserests an den Argininrest 177 des Aktinmoleküls katalysieren. In allen Fällen dient das zytosolische Nicotinamidadenindinukleotid der Zielzelle als Cosubstrat. Auch in der Substratspezifität unterscheidet sich die Iota-Toxin Familie vom C2-Toxin. Während dieses ausschließlich das nichtmuskuläre β/γ -Aktin modifiziert, dient den übrigen clostridialen Aktin-ADP-ribosylierenden Toxinen auch das muskuläre α -Aktin als Substrat (Schering *et al.*, 1988).

Die Modifikation von G-Aktin durch den ADP-Riboserest führt durch sterische Hinderung zur Hemmung der Aktinpolymerisation und so zur Zerstörung des Aktinzytoskeletts der Zielzellen. Aktin bildet ein polares Filament mit einem depolymerisierenden Ende (Minus-Ende, *pointed end*) und einem polymerisierenden Ende (Plus-Ende, *barbed end*). Am *barbed end* wird kontinuierlich G-Aktin ins Filament eingebaut, während am *pointed end* eine stetige Depolymerisation stattfindet. Dies wird als *treadmilling* des Aktins bezeichnet (Wegner and Aktories, 1988). Wird ein ADP-ribosyliertes G-Aktinmolekül am polymerisierenden Ende eingebaut, fungiert es als *capping*-Protein, das die weitere Polymerisation blockiert. Das am Minus-Ende frei werdende G-Aktin steht nun zusätzlich als Substrat für die ADP-Ribosyltransferase zur Verfügung. Dieser Effekt wird als *trapping* bezeichnet. Die überwiegende Depolymerisation am Minus-Ende führt zum Verlust des fibrillären Aktins in den Zielzellen (Barth and Aktories, 2011). Abbildung 1 zeigt schematisch die molekulare Wirkung der ADP-Ribosylierung auf das Aktinzytoskelett.

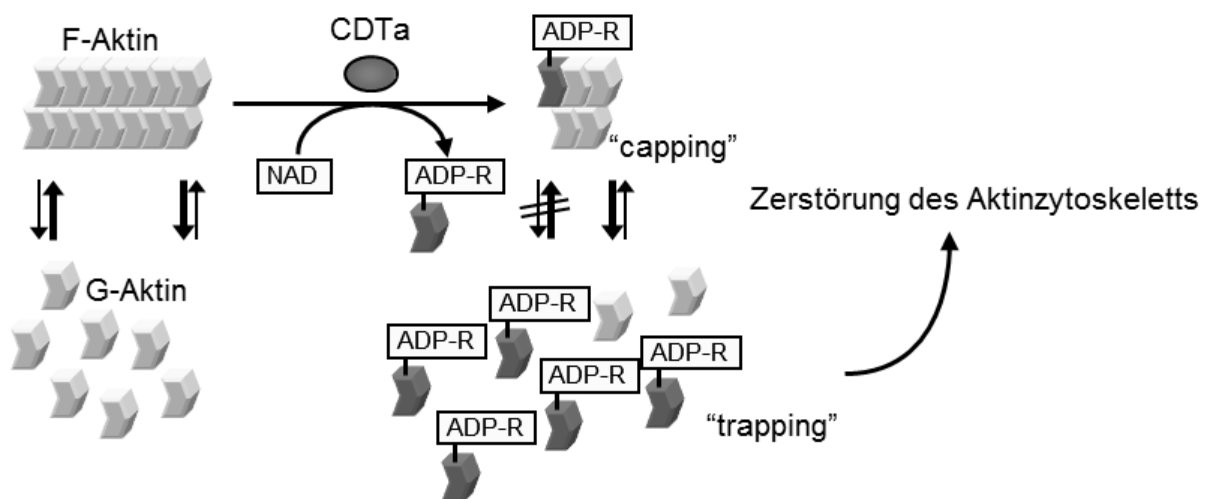


Abbildung 1: Schematische Darstellung des molekularen Wirkmechanismus der enzymatischen Komponente der *Clostridium difficile*-Transferase (CDTa) auf das Aktinzytoskelett. CDTa katalysiert die Übertragung eines ADP-Riboserests (ADP-R) auf monomeres Aktin (G-Aktin). Zur Depolymerisation des Aktinzytoskeletts durch CDTa führt der *capping*-Effekt. Ein mit ADP-Riboserest modifiziertes G-Aktinmolekül, das am polymerisierenden Ende des fibrillären Aktins (F-Aktin) angelagert wird, fungiert als sogenanntes *capping*-Protein. Durch dessen Anlagerung kann kein weiteres G-Aktin angefügt werden und die Polymerisation stoppt. Dies ist dargestellt durch die durchgestrichenen Pfeile am polymerisierenden Ende. Es kommt zu einer überwiegenden Depolymerisation am Minus-Ende des Aktinpolymers. Das anfallende G-Aktin kann nun auch durch CDTa modifiziert werden. Ein als *trapping* bezeichneter Effekt, der die Depolymerisation des F-Aktins weiter voran treibt. Modifiziert nach Gerding *et al.*, 2014.

2.2.1.1. Die ADP-Ribosylierung

Als ADP-Ribosylierung wird die Übertragung eines oder mehrerer ADP-Ribosereste von Nicotinamidadenindinukleotid auf verschiedene Akzeptoraminosäuren bezeichnet. Diese Vorgänge werden von verschiedenen Enzymklassen katalysiert. Mono-ADP-Ribosyltransferasen katalysieren die Übertragung eines Riboserestes, während Poly-ADP-

Ribosyltransferasen den Transfer mehrerer ADP-Ribosereste auf eine Akzeptoraminosäure vermitteln. Als Akzeptoraminosäuren dienen beispielsweise die Glutamat-, Aspartat- oder Argininreste verschiedener Proteine. Abbildung 2 zeigt den molekularen Vorgang einer Mono-ADP-Ribosylierung am Beispiel der Übertragung einer ADP-Ribose auf Arginin wie im Fall von CDT und Aktin.

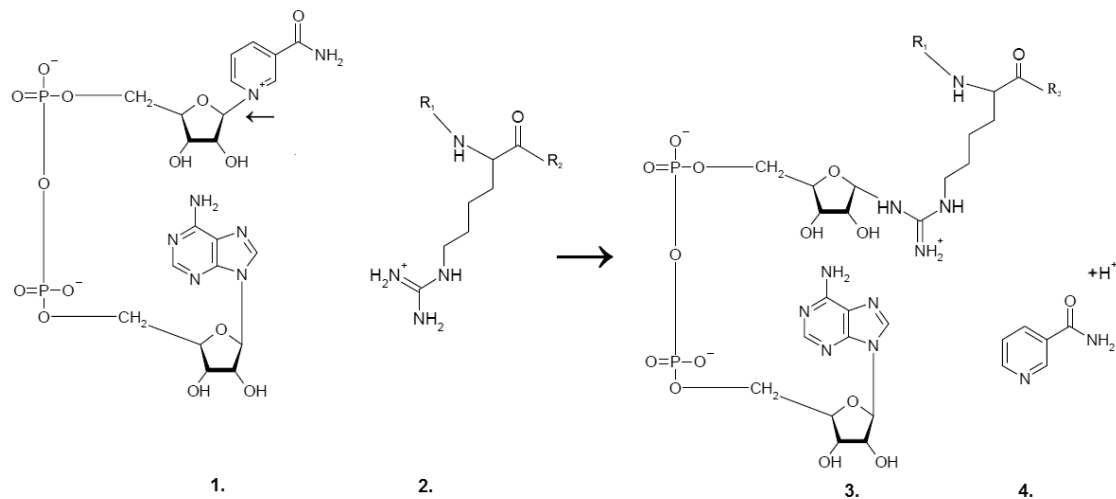


Abbildung 2: Darstellung der ADP-Ribosylierung einer Argininseitenkette anhand der Strukturformeln des Cosubstrats Nicotinamadenindinukleotid (NAD) und der Akzeptoraminosäure Arginin. Das als Cosubstrat dienende NAD (1.) erfährt einen nukleophilen Angriff (Pfeil) durch den Argininrest (2.) an der N-glykosidischen Bindung zwischen Ribose und Nicotinamid. Der Stickstoff des Arginins bildet nun selbst, im Sinne einer nukleophilen Substitution, eine N-glykosidische Bindung zum 1' Kohlenstoffatom der Ribose aus (3.). Nicotinamid wird dabei abgespalten (4.).

2.2.1.1.1. Eukaryote ADP-Ribosyltransferasen

Mono-ADP-Ribosyltransferasen werden in Säugetieren in verschiedenen Zelltypen und Geweben gefunden (Okazaki and Moss, 1999). Hier kommen ADP-Ribosyltransferasen sowohl zytosolisch als auch durch Glykosylphosphatidylinositol-Anker an die äußere Plasmamembran gebundene Proteine vor. Außerdem werden ADP-Ribosyltransferasen von Zellen ins umgebende Milieu sezerniert. Mono-ADP-Ribosyltransferasen sind an verschiedenen zellbiologischen Prozessen beteiligt. Als zellgebundene Enzyme modifizieren sie beispielsweise Integrine und Defensine sowie andere Zelloberflächenproteine (Corda and Di Girolamo, 2003). Obwohl für zytosolische Mono-ADP-Ribosyltransferasen verschiedene regulative Effekte auf die Signaltransduktion und den Stoffwechsel beschrieben wurden, ist die zelluläre Funktion von Mono-ADP-Ribosyltransferasen noch weitgehend unklar. ADP-Ribosylierungen sind in der Regel reversibel. Die Bindung an Argininseitenketten kann beispielsweise durch ADP-Ribosylarginin-Hydrolasen gespalten werden (Takada *et al.*, 1994). So dienen ADP-Ribosereste in der zellulären Signaltransduktion ähnlich wie andere posttranslationale Modifikationen von Proteinen als Schalter, die aktive und inaktive Zustände

definieren können. Poly-ADP-Ribosyltransferasen oder Poly-(ADP-Ribose)-Polymerasen (PARP) sind unter anderem im Zellkern lokalisiert und katalysieren die ADP-Ribosylierung vieler Schlüsselproteine von DNA-Reperaturmechanismen. Dabei werden verzweigt-kettige ADP-Ribosepolymere aus bis zu mehreren hundert Molekülen aufgebaut (Sugimura and Miwa, 1994; de Murcia *et al.*, 1994). Zielproteine von PARP sind beispielsweise die Topoisomerasen I und II (Ferro *et al.*, 1983), die DNA-Polymerasen α und β , die DNA-Ligase II (Yoshihara *et al.*, 1985) sowie Histone (Ogata *et al.*, 1980). Nach DNA-Schäden geringeren Ausmaßes werden PARP-abhängige DNA-Reperaturmechanismen aktiviert, während DNA-Schäden größeren Ausmaßes auch PARP-abhängige Apoptosemechanismen auslösen können (Pieper *et al.*, 1999).

2.2.1.1.2. Prokaryote ADP-Ribosyltransferasen

Am detailliertesten sind prokaryote ADP-Ribosyltransferasen untersucht, die von Bakterien als Exotoxine oder Effektoren produziert werden. Ihre toxische Wirkung beruht auf der ADP-Ribosylierung verschiedenster Zielproteine in Wirtszellen. Die erste beschriebene ADP-Ribosyltransferase ist das Diphtherietoxin von *Corynebacterium diphtheriae*. Dieses modifiziert den eukaryoten Elongationsfaktor eEF-2, was zu einer Hemmung der Proteinbiosynthese in den Zielzellen führt (Wilson *et al.*, 1990; Honjo *et al.*, 1968). Ebenso wirkt das Exotoxin A von *Pseudomonas aeruginosa* (Lukac and Collier, 1988). Cholera-Toxin von *Vibrio cholerae* und das hitzelabile Enterotoxin von *Escherichia coli* ADP-ribosylieren verschiedene α -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine, hauptsächlich aber $G\alpha_s$, welches dadurch konstitutiv aktiviert wird (Moss *et al.*, 1979; Passador and Iglewski, 1994). Eine weitere bakterielle ADP-Ribosyltransferase ist das Pertussistoxin von *Bordetella pertussis*. Dieses modifiziert verschiedene α -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine, hauptsächlich aber $G\alpha_i$, welches dadurch inaktiviert wird (Krueger and Barbieri, 1995). Eine Aktin-ADP-Ribosyltransferase ist der PTC3 Toxin-Komplex von *Photobacterium luminescens*, der die ADP-Ribosylierung der Aminosäure Thr-148 von G-Aktin katalysiert, was dessen Polymerisation zu F-Aktin verstärkt (Lang *et al.*, 2010).

2.2.1.1.3. Prokaryote binäre Aktin-ADP-Ribosyltransferasen

Verschiedene gram-positive Bakterien der Gattungen *Bacillus* und *Clostridium* produzieren binäre Exotoxine mit Aktin-ADP-Ribosyltransferaseaktivität. Binär bedeutet hier, dass sich das Gesamttoxin aus zwei Komponenten zusammensetzt. Nämlich aus einer Binde- und Translokationskomponente sowie aus einer enzymatisch aktiven Komponente mit ADP-Ribosyltransferaseaktivität. Eine Übersicht geben Barth *et al.*, 2004. Die Vertreter der

clostridialen Aktin-ADP-Ribosyltransferasen werden, wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben, in die Iota-Toxin Familie (Iota-Toxin, CST und CDT) und das C2-Toxin eingeteilt. Weitere Vertreter der binären Aktin-ADP-Ribosyltransferasen sind die vegetativen insektizidalen Proteine (VIP) von *Bacillus cereus* und *Bacillus thuringiensis* (Han *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2003). Sie alle führen zur Depolymerisation des Aktinzytoskeletts durch Modifikation von G-Aktin an der Position Arg-177. Eine Übersicht gibt Tabelle 1.

Tabelle 1: Übersicht über die bekannten binären Aktin-ADP-ribosylierenden bakteriellen Toxine.

Organismus/Toxin	Komponenten	Modifizierte Aminosäure
<i>Clostridium perfringens</i> Iota-Toxin	Ia (Enzym) Ib (Bindung)	Arg-177
<i>Clostridium spiroforme</i> CST	CSTa (Enzym) CSTb (Bindung)	Arg-177
<i>Clostridium difficile</i> CDT	CDTa (Enzym) CDTb (Bindung)	Arg-177
<i>Clostridium botulinum</i> C2-Toxin	C2I (Enzym) C2II (Bindung)	Arg-177
<i>Bacillus cereus/thuringiensis</i> VIP	VIP2 (Enzym) VIP1 (Bindung)	Arg-177

2.2.1.2. Aufbau von CDT

2.2.1.2.1. CDTa

CDTa wird als 463 Aminosäuren großes und 53 kDa schweres Protein synthetisiert, wobei die ersten 43 Aminosäuren wahrscheinlich als Signalsequenz dienen und proteolytisch abgespalten werden (Gerding *et al.*, 2014). Das reife CDTa (48 kDa) weist eine Sequenzidentität zur enzymatischen Komponente des Iota-Toxins von 84 % und 82 % zu CSTa von *Clostridium spiroforme* auf. Die Sequenzen anderer Aktin-ADP-Ribosyltransferasen weisen dagegen nur eine geringe Identität zu CDTa auf (34 % mit VIP2 von *Bacillus cereus* und 29 % mit C2I von *Clostridium botulinum*) (Gerding *et al.*, 2014). Auch wenn sich hier große Sequenzunterschiede zeigen, so sind Aufbau und Struktur der enzymatischen Komponenten der Aktin-ADP-Ribosyltransferasen untereinander sehr ähnlich. CDTa ist aus zwei Domänen aufgebaut, einer N-terminalen Domäne (Aminosäuren 1-215) und der C-terminalen Domäne, die von den Aminosäuren 224-420 gebildet wird. Die beiden Domänen sind durch eine Aminosäurekette (*loop*, Aminosäuren 216-223) miteinander verbunden. Die N-terminale Domäne besteht aus acht β -Faltblättern und fünf α -Helices

(Sundriyal *et al.*, 2009), die die sogenannte Adapterdomäne bilden. Sie vermittelt die Bindung an die Bindekomponente CDTb. Die C-terminale Domäne ist ebenfalls aus acht β -Faltblättern und fünf α -Helices aufgebaut und beherbergt die ADP-Ribosyltransferase. Die Domänenstruktur von CDTa ist in Abbildung 3 dargestellt.

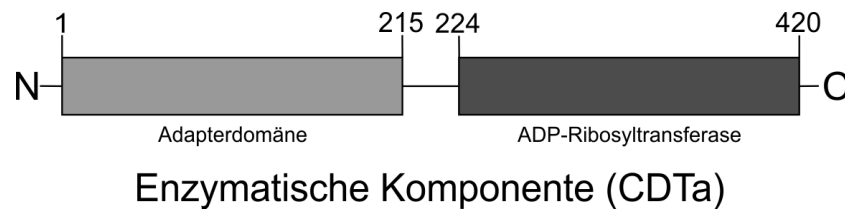
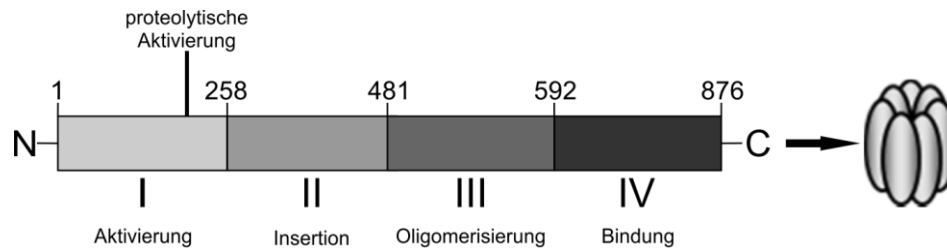


Abbildung 3: Domänenstruktur der enzymatischen Komponente CDTa der *Clostridium difficile*-Transferase. Am Amino-Terminus des Proteins befindet sich die Adapterdomäne, die die Interaktion mit der Binde- und Translokationskomponente CDTb vermittelt. Am Carboxy-Terminus ist die ADP-Ribosyltransferasedomäne lokalisiert, welche von den Aminosäuren 224-420 gebildet wird. Sie beherbergt die enzymatische Aktivität von CDTa. Beide Domänen weisen eine gleiche Faltung aus acht β -Faltblättern und fünf α -Helices auf und sind durch eine Aminosäurekette (loop, Aminosäuren 216-223) miteinander verbunden. Modifiziert nach Gerding *et al.*, 2014.

2.2.1.2.2. CDTb

CDTb besteht aus 876 Aminosäuren, hat eine Masse von 98,8 kDa (Perelle *et al.*, 1997) und wird in vier funktionelle Domänen unterteilt. CDTb weist gegenüber den anderen Bindekomponenten der Iota-Toxin-Familie hohe Sequenzidentitäten auf, 80 % zu der Bindekomponente des Iota-Toxins und 79 % zu CSTb (Gerding *et al.*, 2014). Eine signifikante Sequenzhomologie (36 %) besteht auch zum protektiven Antigen (PA), der Bindekomponente des Anthrax-Toxins von *Bacillus anthracis* (Young and Collier, 2007). Diese Strukturverwandtschaft erwies sich als hilfreich, da Struktur, Porenbildung und Translokation des Anthrax-Toxins gut untersucht waren und so maßgeblich zum Verständnis dieser Prozesse beim CDT beitragen konnten (Gerding *et al.*, 2014). CDTb lässt sich wie folgt untergliedern. Die N-terminalen Aminosäuren 1-257 bilden Domäne I, die sogenannte Aktivierungsdomäne. Hier erfolgt die Aktivierung von CDTb durch proteolytische Abspaltung eines etwa 20 kDa schweren Fragments (1-209) (Perelle *et al.*, 1993; Barth *et al.*, 2004). Der verbleibende Teil der Aktivierungsdomäne kann dann durch die Adapterdomäne des CDTa gebunden werden. Die Spaltung erfolgt unter anderem durch Serinproteasen des Wirts wie Trypsin oder Chymotrypsin. Das aktivierte CDTb hat eine Masse von 75 kDa. Die Aktivierung sorgt für eine Konformationsänderung in der Proteinstruktur (Davies *et al.*, 2011), welche die Oligomerisierung der Bindekomponente zu einem homoheptameren Komplex ermöglicht (Barth *et al.*, 2004). Diese Oligomerisierung wird von Domäne III vermittelt, die die Aminosäuren 481-591 umfasst. Domäne II (Aminosäuren 258-480) vermittelt die Membraninsertion und Porenbildung des Toxin-Komplexes. Durch die gebildete Pore erfolgt die Translokation der enzymatischen Komponente aus dem

endosomalen Kompartiment ins Zytosol. Die C-terminal lokalisierte Domäne IV bildet die Rezeptorbindedomäne von CDTb (Aminosäuren 592-876). Abbildung 4 zeigt eine Darstellung der Domänenstruktur von CDTb.



Binde- und Translokationskomponente (CDTb)

Abbildung 4: Domänenstruktur der Binde- und Translokationskomponente CDTb der *Clostridium difficile*-Transferase. CDTb setzt sich aus vier funktionell verschiedenen Domänen zusammen. Die am Amino-Terminus lokalisierte Aktivierungsdomäne (Domäne I, Aminosäuren 1-258) unterliegt einer proteolytischen Spaltung, unter anderem durch Serinproteasen des Wirts, wobei ein etwa 20 kDa schweres Fragment (Aminosäuren 1-209) vom N-Terminus abgespalten wird. Diese Spaltung ist für die Aktivität von CDTb essenziell. An den verbleibenden Rest der Domäne I bindet die enzymatische Komponente CDTa mit der Adapterdomäne. Domäne II (Aminosäuren 258-481), die sogenannte Insertionsdomäne, ist an der Insertion und Porenbildung des Toxin-Komplexes in die Endosomenmembran beteiligt. Die Domäne III (Aminosäuren 481-592) bewirkt die Oligomerisierung der CDTb-Monomere zu einem homoheptameren Komplex. Die Oligomerisierung ist dargestellt durch den Pfeil am Carboxy-Terminus des Domänenmodells und den abgebildeten heptameren CDTb-Komplex. Am Carboxy-Terminus von CDTb befindet sich die Bindedomäne (Aminosäuren 592-876), die die Bindung an den Wirtszellrezeptor vermittelt. Modifiziert nach Gerding *et al.*, 2014.

2.2.1.3. Bindung und Aufnahme von CDT

2.2.1.3.1. Bindung von CDT

CDT bindet an seine Zielzellen durch den *lipolysis stimulated lipoprotein receptor* (LSR) (Papatheodorou *et al.*, 2011), ein Typ-1-Transmembranprotein, das hauptsächlich in Leber und Darm exprimiert wird (Mesli *et al.*, 2004; Yen *et al.*, 1999). Die physiologische Funktion des LSR wird in der zellulären Aufnahme von Lipoproteinen niedriger Dichte vermutet, besonders von Chylomikronen (Yen *et al.*, 1994; Bihain and Yen, 1998). LSR dient auch der Bildung trizellulärer Zell-Zell-Verbindungen (Higashi *et al.*, 2013). LSR ist ebenfalls der Zellrezeptor für das Iota-Toxin von *C. perfringens* sowie CST von *C. spiroforme* (Papatheodorou *et al.*, 2012; Papatheodorou *et al.*, 2011).

Für die Bindung von CDT an den Rezeptor werden zwei verschiedene Wege diskutiert. Zum einen könnte sich nach der proteolytischen Aktivierung von CDTb ein oligomerer Komplex in Lösung bilden und dieser dann in toto an den Rezeptor binden. Möglich ist auch eine Bindung einzelner CDTb-Moleküle an den Rezeptor und eine Heptamerisierung der gebundenen Toxinkomponenten (Aktories *et al.*, 2012). Abbildung 5 stellt dies schematisch dar. Nach Studien zur Bindung und Aufnahme des Iota-Toxins (Nagahama *et al.*, 2004) wird vermutet, dass nach Bindung der aktivierten monomeren Bindekomponenten an den zellulären Rezeptor

der Toxin-Rezeptor-Komplex in *lipid rafts* akkumuliert. Dadurch soll die Oligomerisierung der Bindekomponenten ausgelöst werden. Ähnliche Beobachtungen wurden auch direkt für CDTb und den gemeinsamen Rezeptor LSR gemacht (Papatheodorou *et al.*, 2013). Auch für den Rezeptor des Anthrax-Toxins von *B. anthracis* konnte dies gezeigt werden (Abrami *et al.*, 2003). Untersuchungen weisen auf die Beteiligung des Glykoproteins CD44 bei der Bindung und Aufnahme der Iota-Toxin-Familie hin (Wigelsworth *et al.*, 2012).

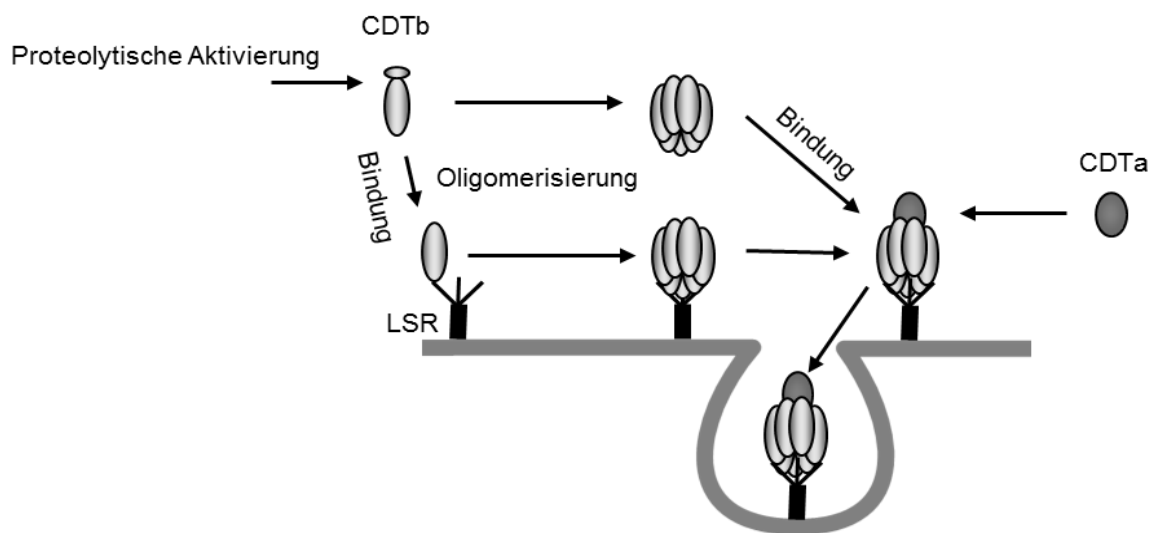


Abbildung 5: Schematische Darstellung der verschiedenen Modelle der Bindung und Aufnahme von CDT an seinen Wirtszellrezeptor LSR (*lipolysis stimulated lipoprotein receptor*). Nach proteolytischer Aktivierung der Binde- und Translokationskomponente CDTb kann diese an LSR binden. Ob sich zunächst Heptamere in Lösung bilden, welche an den Rezeptor binden, oder ob monomeres CDTb an den Rezeptor binden kann und die Oligomerisierung dort stattfindet, wird kontrovers diskutiert. Nach der Bindung der enzymatischen Komponente CDTa an die oligomerisierten CDTb-Untereinheiten kommt es zur Aufnahme des Toxin-Rezeptor-Komplexes. Modifiziert nach Aktories *et al.*, 2012.

2.2.1.3.2. Endozytose und Translokation von CDT

Mechanismen der Aufnahme und Translokation der clostridialen Aktin-ADP-ribosylierenden Toxine wurden detailliert für das C2-Toxin (Barth *et al.*, 2000; Blöcker *et al.*, 2003a; Blöcker *et al.*, 2003b) und das Iota-Toxin beschrieben (Nagahama *et al.*, 2004; Hale *et al.*, 2004; Blöcker *et al.*, 2001). Für CDT wurden die Aufnahmemechanismen größtenteils von den Studien dieser homologen Toxine abgeleitet. Für Iota-Toxin geht man davon aus, dass durch die Bindung der enzymatischen Komponente die Endozytose des Toxin-Rezeptor-Komplexes ausgelöst wird. Für das C2-Toxin sowie das Iota-Toxin wurde gezeigt, dass die enzymatischen Komponenten aus dem frühen endosomalen Kompartiment ins Zytosol gelangen, ein Vorgang, der als Translokation bezeichnet wird. Das frühe endosomale Kompartiment erfährt eine Ansäuerung durch H^+ -ATPasen (Wang and Hiesinger, 2013). Angenommen wird, dass durch die Absenkung des pH-Werts im frühen Endosom eine Konformationsänderung des Toxin-Komplexes induziert wird. Dies führt zu einer Exposition

hydrophober Aminosäurereste, die eine Porenbildung des Toxin-Komplexes in die endosomale Membran ermöglichen. Diese Studien wurden insbesondere mit C2-Toxin durchgeführt (Barth *et al.*, 2000; Blöcker *et al.*, 2003a). Am detailliertesten sind allerdings Porenbildung und Translokation für das verwandte PA, der Binde- und Translokationskomponente des Anthrax-Toxins, aufgeklärt worden (Petosa *et al.*, 1997; Krantz *et al.*, 2004; Krantz *et al.*, 2005; Krantz *et al.*, 2006). Auch die Porenbildung des C2- und Iota-Toxins sind weitergehend charakterisiert worden, vor allem durch Studien an artifiziellen Membransystemen (Schmid *et al.*, 1994; Bachmeyer *et al.*, 2001; Lang *et al.*, 2008; Blöcker *et al.*, 2003a; Blöcker *et al.*, 2003b). Für den eigentlichen Translokationsprozess der enzymatischen Komponente ins Zytosol kommt es wahrscheinlich zu einer Auffaltung von CDTa und einer entsprechenden Rückfaltung im Zytosol der Zielzelle. Dies konnte für die Translokation des Anthrax- und des C2-Toxins gezeigt werden (Krantz *et al.*, 2005; Haug *et al.*, 2003). Untersuchungen zur Aufnahme clostridialer Aktin-ADP-ribosylierender Toxine zeigten weiter, dass wirtszelleigene Chaperone wie Hsp90 oder Cyclophilin A, die bei der Rückfaltung der enzymatischen Komponenten im Zytosol helfen sollen, essenziell für die Intoxikation sind (Haug *et al.*, 2004; Kaiser *et al.*, 2009). Eine Darstellung dieser Prozesse zeigt Abbildung 6.

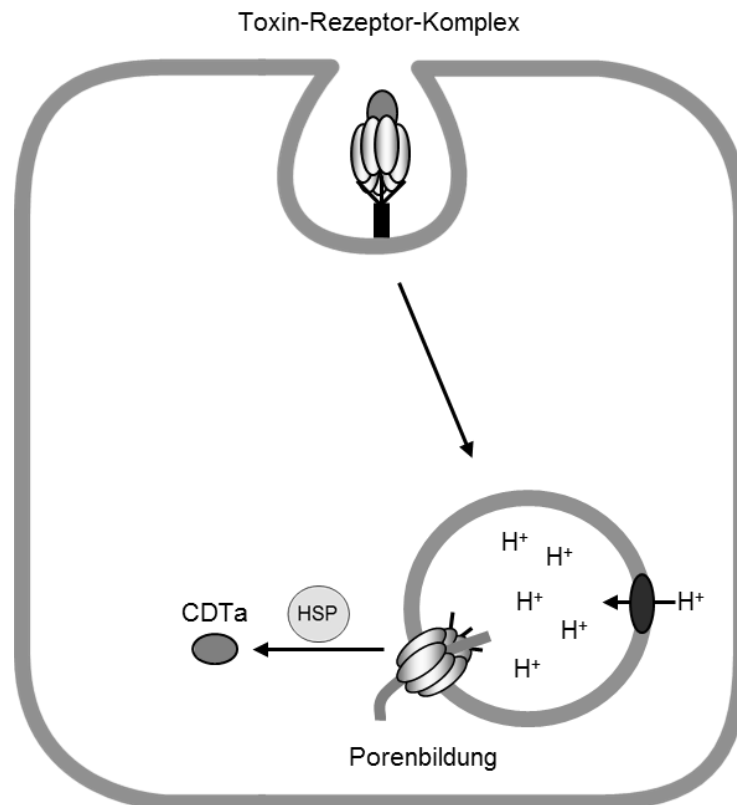


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Porenbildung des Toxin-Komplexes und der Translokation von CDTa aus dem frühen endosomalen Kompartiment. Nach der Endozytose des Toxin-Rezeptor-Komplexes von der Zelloberfläche kommt es im frühen endosomalen Kompartiment zur Ansäuerung durch H^+ -ATPasen. Die Absenkung des pH-Werts führt zu einer Konformationsänderung des Toxin-Komplexes innerhalb des Endosoms. Die Exposition von hydrophoben Aminosäureresten ermöglicht die Insertion in die endosomale Membran und eine Porenbildung des Toxin-Komplexes. Durch die Pore gelangt die aufgefaltete enzymatische Komponente CDTa ins Zytosol. An der Rückfaltung der Domänen von CDTa sind wirtszelleigene Chaperone wie zum Beispiel Cyclophilin A und Hsp90 beteiligt (HSP). Modifiziert nach Gerding *et al.*, 2014.

2.2.1.4. Toxizität und zelluläre Effekte von CDT

Wie bereits unter 2.2.1 detaillierter beschrieben wurde, führt CDT zur Depolymerisation des Aktinzytoskeletts durch Anheftung eines ADP-Riboserests an Arg-177 von G-Aktin. Diese Modifikation befindet sich an einer Aktin-Aktin-Interaktionsfläche, was die Aktinpolymerisation verhindert. Zusätzlich wird auch die Interaktion mit Gelsolin, einem 82 kDa schweren Aktin-bindenden Protein, durch die ADP-Ribosylierung gestört (Wille *et al.*, 1992). Die ATP-Hydrolysekapazität von Aktin wird durch die ADP-Ribosylierung ebenfalls herabgesetzt (Geipel *et al.*, 1989). Durch die Zerstörung des formgebenden Aktinzytoskeletts runden CDT-sensitive Zellen unter Zellkulturbedingungen ab (Papatheodorou *et al.*, 2011). In Verbänden intestinaler Epithelzellen wird nach Zugabe des homologen Iota-Toxins eine Abnahme des epithelialen Widerstands gemessen (Blocker *et al.*, 2001). Tierexperimentelle Arbeiten mit dem verwandten C2-Toxin zeigen eine Letalität des Toxins nach intravenöser Injektion und eine erhöhte Gefäßpermeabilität nach intradermalen Injektion (Simpson, 1982; Ohishi, 1983).

2.2.1.4.1. Effekte von CDT auf das Mikrotubulizytoskelett und die Pathogenadhäsion

Kürzlich wurde die Bildung zellulärer Protrusionen durch CDT und andere binäre clostridiale Aktin-ADP-ribosylierende Toxine beschrieben, die auf dem Mikrotubulizytoskelett als struktureller Komponente basieren (Schwan *et al.*, 2009). Die Studien wurden in verschiedenen humanen intestinalen epithelialen Zelllinien und primären Darmepithelzellen aus dem Rattenkolon durchgeführt. Die Protrusionen bilden sich vorrangig an Stellen, an denen das kortikale Aktinzytoskelett durch CDT zerstört wird. Elektronenmikroskopische Studien zeigen ein dichtes Netzwerk dieser zellulären Ausläufer, in denen sich Clostridien verfangen. In vitro- und in vivo-Studien im Mausmodell ergaben, dass durch CDT die Adhäsion von Clostridien an Epithelien sowie die Kolonisation der Keime im Kolon und Zäkum signifikant erhöht wird.

Es werden auch Effekte der CDT-Intoxikation auf die Mikrotubulipolymerisation beschrieben. In CDT-behandelten Caco-2-Zellen weisen Mikrotubuli deutlich längere Phasen der Polymerisation auf, wobei die Geschwindigkeit der Polymerisation signifikant abnimmt. Beobachtet wurde auch eine deutlich stärkere Assoziation von +Ende-bindenden Proteinen wie EB1 oder EB3 (*endbinding protein 1/3*) an Mikrotubuli. CDT hat ebenfalls einen Einfluss auf die Lokalisation Mikrotubuli-assoziiierter Proteine wie ACF7 (*actin cross linking factor 7*) oder CLASP2 (*cytoplasmic linker associated protein 2*), die nach Toxin-induzierter Zerstörung des Aktinzytoskeletts vom zellulären Kortex ins Zellinnere relokalisieren. So könnten auch Mikrotubuli-assoziierte Proteine einen Einfluss auf die Ausläuferbildung haben, beispielsweise durch ein vermindertes *capturing* der Mikrotubuli am Zellkortex.

So ist CDT der Auslöser eines neuen Mechanismus der Wirt-Pathogen-Interaktion, bei dem ein bakterielles Toxin zellmorphologische Veränderungen durch das Mikrotubulizytoskelett bewirkt, was zur Erhöhung der bakteriellen Adhäsion an die Zielzellen führt. In Abbildung 7 und Abbildung 8 ist dieser Effekt dargestellt. Weitere Untersuchungen zum Einfluss von CDT auf die Pathogenadhäsion zeigten, dass ebenfalls das Vorhandensein von Endoplasmatischem Retikulum in den Protrusionen und zeitgleiche Mikrotubuli-abhängige Kalziumsignale sowie Rab11-abhängiger Vesikeltransport zu einer Umverteilung von basalem Fibronectin an die Zelloberfläche führen. Da Clostridien über Fibronectinbindepoteine verfügen, könnten diese Prozesse ebenfalls die Pathogenadhäsion fördern (Schwan *et al.*, 2014).

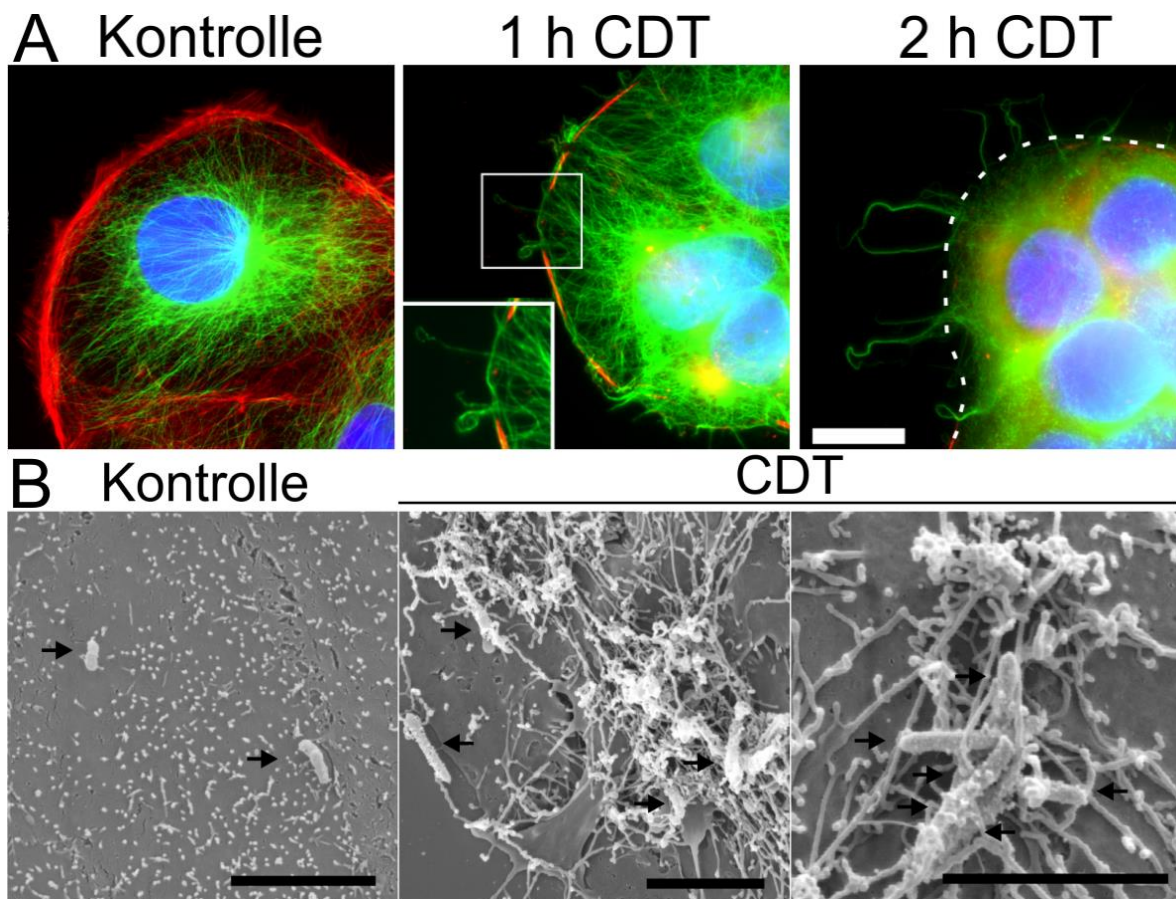


Abbildung 7: Immunfluoreszenzmikroskopische und elektronenmikroskopische Darstellung des Effekts von CDT auf das Zytoskelett und des Effekts der Ausläuferbildung in Caco-2-Zellen. (A) Durch Fluoreszenzmikroskopie dargestellt sind das Aktinzytoskelett (rot), das Mikrotubulizytoskelett (grün) und der Zellkern (blau). Über die Zeit ist die Zerstörung des Aktinzytoskeletts durch CDT zu beobachten. Zusätzlich zeigt sich die zeitabhängige Bildung Mikrotubuli-basierter Zellausläufer. Der vergrößerte Ausschnitt nach 1 h CDT-Behandlung zeigt die Protrusionen an der Stelle, wo sich das kortikale Aktin aufgelöst hat. Der Kalibrationsbalken entspricht 20 μm . (B) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Caco-2-Zellen, die vor der Fixierung mit *C. difficile*-Keimen inkubiert wurden. Zuvor wurden die Zellen mit CDT behandelt oder sind unbehandelt geblieben (Kontrolle). Die CDT-behandelten Zellen zeigten ein Netzwerk von zellulären Ausläufern, in dem sich vermehrt Clostridien befanden (schwarze Pfeile). Auf der Oberfläche unbehandelter Zellen fanden sich Mikrovilli und weniger Clostridien (schwarze Pfeile). Die Kalibrationsbalken entsprechen 5 μm . Modifiziert nach Schwan *et al.*, 2009.

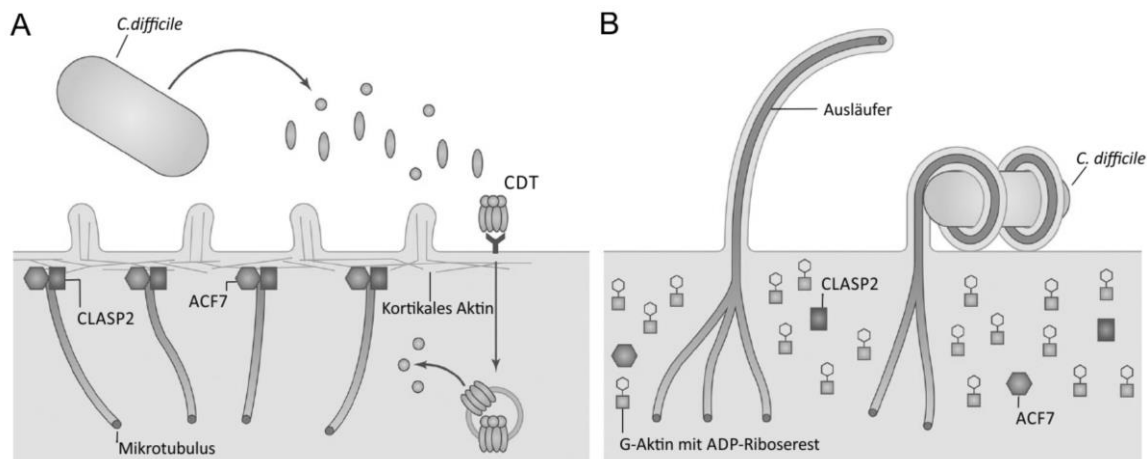


Abbildung 8: Schematische Darstellung des beobachteten Effekts von CDT auf das kortikale Aktin- und Mikrotubulizytoskelett und des beobachteten Effekts auf die Pathogenadhäsion durch Mikrotubuli-basierte Zellausläufer. (A) Das von *C. difficile* produzierte CDT wird in die Zielzellen aufgenommen. Am Zellkortex sind die Mikrotubuli über +TIPs (*plus-end tracking proteins*) wie CLASP2 (*cytoplasmic linker associated protein 2*) und ACF7 (*actin cross linking factor 7*) mit dem Aktinzytoskelett und der Plasmamembran verbunden. (B) Die Zerstörung des kortikalen Aktinzytoskeletts durch die Wirkung von CDT führt zu einer Relokalisierung der Mikrotubuli-assoziierten Proteine CLASP2 und ACF7 ins Zellinnere. Mikrotubuli überwinden den Zellkortex und bilden zelluläre Ausläufer, in denen sich Clostridien verfangen und die so die Pathogenadhäsion erhöhen können. Modifiziert nach Haglund und Welch, 2011.

2.3. Das Zytoskelett

Da sich die vorliegende Arbeit mit der Wirkung der *Clostridium difficile*-Transferase auf verschiedene zytoskelettale Komponenten befasst, werden diese hier eingehender vorgestellt. Das Zytoskelett eukaryoter Zellen erfüllt viele verschiedene Aufgaben, vor allem verleiht es Zellen und Zellverbänden Stabilität. Das Zytoskelett bestimmt die Zellmorphologie bei der Migration, Polarisation, Adhäsion, Teilung und Differenzierung von Zellen, außerdem dient es dem zellulären Vesikeltransport. Für diese und viele andere zelluläre Vorgänge ist seine Funktion unerlässlich. Das Zytoskelett besteht aus vier verschiedenen Filamenttypen: Aktin-, Mikrotubuli-, Intermediär- und Septinfilamenten (Mostowy and Cossart, 2012). Diese Bestandteile bilden ein dynamisches Gerüst und Netzwerk, das stetig modelliert wird (Mitchison, 1995). Oft sind direkte und indirekte Interaktionen verschiedener zytoskelettaler Komponenten an zellulären Prozessen beteiligt, sodass es einer exakten zeitlichen und räumlichen Koordination der einzelnen Komponenten und ihres Wechselspiels bedarf.

2.3.1. Das Aktinzytoskelett

Aktin ist ein globuläres 42 kDa schweres Protein (G-Aktin), das ATPase-Aktivität besitzt und zu circa 6 nm dicken Mikrofilamenten polymerisiert (F-Aktin). F-Aktin besteht aus einer linksdrehenden Helix (Kabsch and Vandekerckhove, 1992) und ist ein polares Filament. Dies bedeutet, es besitzt ein polymerisierendes Ende (Plus-Ende, +Ende, *barbed end*), an welchem neues G-Aktin ins Filament inkorporiert wird, und ein depolymerisierendes Ende

(Minus-Ende, -Ende, *pointed end*). Abbildung 9 zeigt dies schematisch. Durch den stetigen Einbau der Aktinmonomere am *barbed end* und den Abbau von F-Aktin am *pointed end*, besteht ein kontinuierlicher Fluss der Aktinmoleküle zum *pointed end* hin, ein als *Aktin-treadmilling* bezeichnetes Phänomen (Kirschner, 1980). Das Aktinzytoskelett ist an nahezu allen Zytoskelett-abhängigen Prozessen der Zelle beteiligt. Eine spezielle Rolle kommt F-Aktin in den kontraktilen Zellen der glatten und quergestreiften Muskulatur zu (Pollard and Cooper, 2009; Behrmann *et al.*, 2012). Hier bildet es unter anderem gemeinsam mit Myosin die kontraktilen Elemente der Muskelzellen.

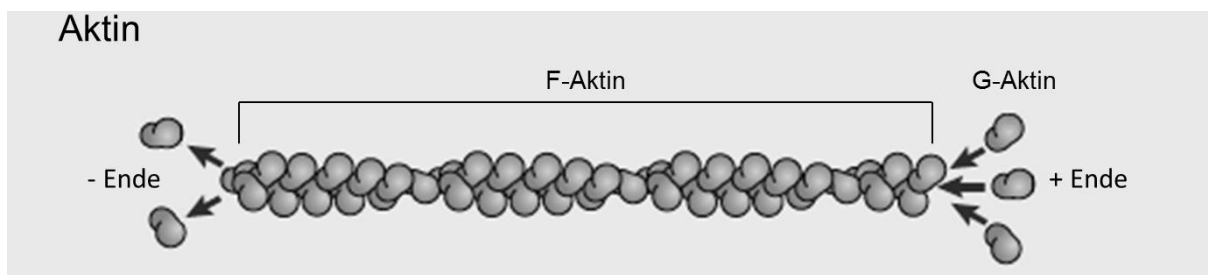


Abbildung 9: Schematische Abbildung eines Aktinfilaments (F-Aktin). Dargestellt ist die Polarität des Filaments und die linksdrehende helikale Struktur. F-Aktin ist circa 6 nm dick und besitzt ein wachsendes Ende (+Ende, *barbed end*), an dem monomeres Aktin (G-Aktin) ins Filament eingebaut wird. Am -Ende oder auch *pointed end* depolymerisiert das Aktinfilament stetig. Modifiziert nach Mostowy und Cossart, 2013.

2.3.1.1. Regulation des Aktinzytoskeletts

Zur Regulation der Polymerisation des Aktinzytoskeletts tragen verschiedene Signalwege und regulatorische Proteine der Zelle bei. Als Hauptregulatoren des Aktinzytoskeletts gelten Rho-GTPasen. Sie sind GTP-hydrolysierende Schaltermoleküle der Zelle, die über verschiedene Effektoren das Aktinzytoskelett beeinflussen (Hall, 1998; Hall and Nobes, 2000). Beispielsweise induziert der RhoA-Effektor (*Ras homolog gene family, member A*) p140mDia (*mammalian diaphanous protein*) die Polymerisation von G-Aktin zu langen Aktinfilamenten (Watanabe *et al.*, 1997). Die Rho-GTPase CDC42 (*cell division control protein 42 homolog*) bewirkt ebenfalls die Aktinpolymerisation, indem sie über WASP (*Wiskott Aldrich syndrome protein*) den ARP 2/3-Komplex (*actin related protein*) aktiviert. Dieser Komplex fungiert als Aktinnukleator, der auch die Verzweigung von Aktinfilamenten vermittelt (Liu *et al.*, 2013; Heasman and Ridley, 2008). Die Depolymerisation von Aktinfilamenten wird beispielsweise gefördert von Proteinen wie Cofilin und Gelsolin. Proteine der Cofilin-Familie binden G-Aktin und beschleunigen so die Depolymerisation am Minus-Ende. Gehemmt wird die Cofilin-Aktivität durch verschiedene Effektoren von Rho-GTPasen. Zum Beispiel führt PAK (p21-*activated kinase*) über LIM-Kinasen (Lin-11, Isl-1 und Mec-3) zu einer Hemmung der Cofilin-Aktivität und fördert so die Aktinpolymerisation.

Gelsolin kann Aktinfilamente schneiden (Pollard and Cooper, 2009; Lappalainen and Drubin, 1997) und reguliert die Aktinpolymerisation auch durch seine Funktion als *capping*-Protein, indem es mit dem Plus-Ende interagiert und so den weiteren Einbau von G-Aktin verhindert (Porte and Harricane, 1986).

2.3.2. Das Mikrotubulizytoskelett

Mikrotubuli sind 25 nm dicke zylindrische und hohle Filamente, die sich aus jeweils 13 Protofilamenten zusammensetzen. Wie die Aktinfilamente sind auch Mikrotubuli polare Strukturen, die ein schnell polymerisierendes Plus-Ende und ein langsam polymerisierendes Minus-Ende aufweisen. Die 55 kDa schweren Tubulinmonomere (α -Tubulin und β -Tubulin) bilden Heterodimere. Beide Monomere binden GTP, jedoch nur das β -Tubulin-gebundene GTP wird während der Polymerisation hydrolysiert (Mostowy and Cossart, 2012). Der vorwiegende Ein- und Ausbau der Tubulindimere erfolgt am Plus-Ende des Filaments, wobei die α -Tubulinmonomere stets zum Minus-Ende gerichtet sind. Das Minus-Ende ist in der Zelle meist am Mikrotubuli-organisierenden Zentrum (*microtubule organizing center*, MTOC) fixiert, wobei das MTOC meist nahe dem Zellkern und dem Golgi-Apparat lokalisiert ist. Das Plus-Ende ist in die Zellperipherie gerichtet (Lansbergen and Akhmanova, 2006; Yamamoto, 2014; Gerding *et al.*, 2014). Am Plus-Ende der Mikrotubuli binden eine Vielzahl verschiedener Proteine (+TIPs, *plus-end tracking proteins*), die die sogenannte dynamische Instabilität des Plus-Endes regulieren. Als dynamische Instabilität bezeichnet man die sich abwechselnden Phasen des Schrumpfens und des Wachsens bestehender Filamente. Der Übergang vom Schrumpfen zum Wachsen der Filamente wird als Rettung (*rescue*), der Übergang vom Wachsen zum Schrumpfen als Katastrophe (*catastrophe*) bezeichnet (Desai and Mitchison, 1997; Akhmanova and Steinmetz, 2008). Am Zellkortex werden Mikrotubuli im Wachstum gestoppt und stabilisiert. Dieses bewirken sogenannte *capturing*-Proteine, die Mikrotubuli vor allem mit dem Aktinzytoskelett und der Plasmamembran verbinden (Lansbergen and Akhmanova, 2006).

In eukaryoten Zellen übernehmen Mikrotubuli verschiedene Aufgaben. So bilden sie zum Beispiel den Spindelapparat während der Kernteilung (Uchida *et al.*, 2013). Auch der größte Anteil des zellulären Vesikeltransports erfolgt entlang der Mikrotubuli. Mittels verschiedener Motorproteine, Kinesinen in Richtung Plus-Ende und Dyneinen in Richtung Minus-Ende, wandern die Vesikel entlang der Mikrotubulifilamente (Cooper, 2000; Vale, 1987). Auch für die Zellmigration und Polarisation sind Mikrotubuli essenziell (Etienne-Manneville, 2013; Musch, 2004). Eine weitere wichtige Funktion kommt den Mikrotubuli als dynamische und

strukturebende Komponente in verschiedenen zellulären Protrusionen zu. Beispielsweise sind sie essenzieller Bestandteil in Dendritenverzweigungen, beim Aufbau von Axonen (Shirao and Gonzalez-Billault, 2013; Prokop, 2013) und in Zilien eukaryoter Zellen (Liu and Zeitlin, 2011). Mikrotubulifilamente und die dynamische Instabilität sind schematisch in Abbildung 10 dargestellt.

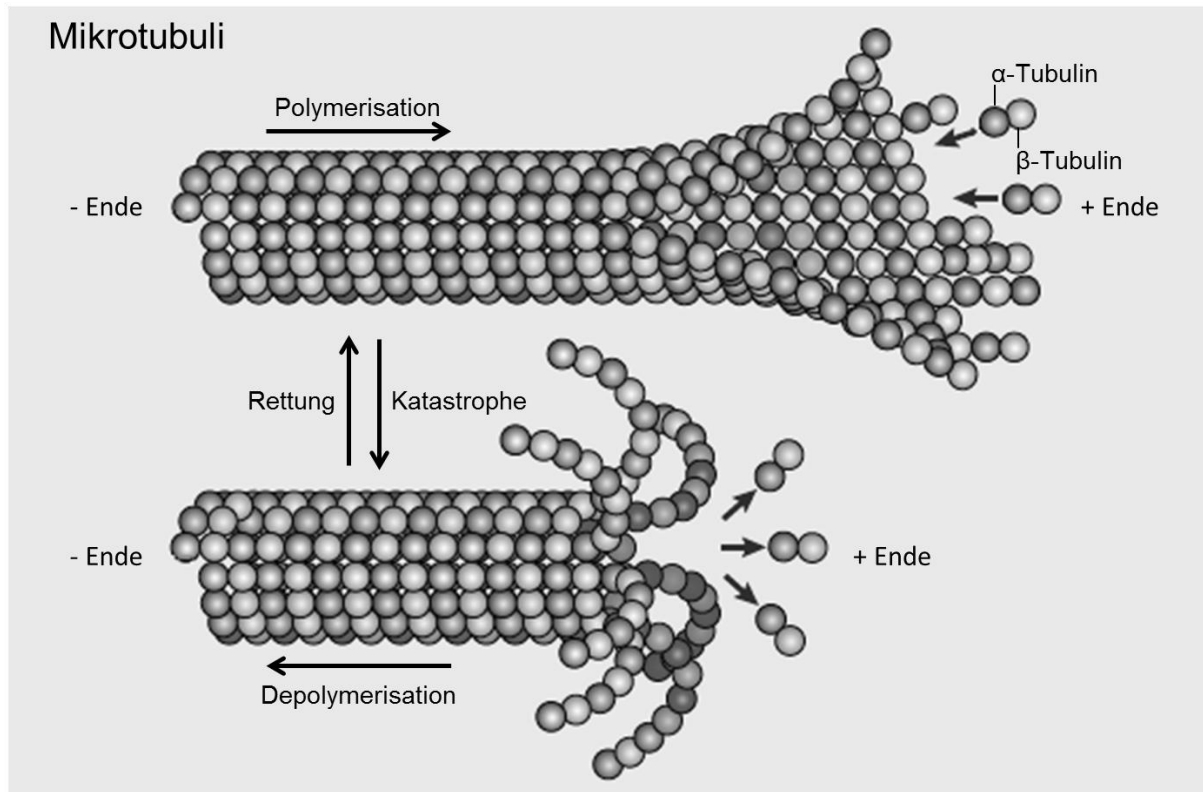


Abbildung 10: Schematische Darstellung von Mikrotubulifilamenten und ihrer dynamischen Instabilität. Mikrotubuli sind circa 25 nm dicke und hohle Filamente, die sich aus heterodimeren Untereinheiten von α - und β -Tubulinmonomeren zusammensetzen. Am +Ende polymerisieren und depolymerisieren die Filamente. Als dynamische Instabilität bezeichnet man die wechselnden Phasen von Wachstum und Schrumpfen der Filamente am +Ende. Übergänge zwischen den Phasen der Polymerisation und Depolymerisation werden als Rettung oder Katastrophe bezeichnet. Modifiziert nach Mostowy und Cossart, 2013.

2.3.2.1. Regulation des Mikrotubulizytoskeletts

Stabilisierend auf Mikrotubuli wirken eine Vielzahl von regulatorischen Proteinen, sogenannte Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs). Entlang der einzelnen Filamente binden MAP2, MAP4 sowie Tau-Proteine (*tubulin associated proteins*), die stabilisierend auf das Netzwerk wirken. Das neuronale MAP2 bindet an den Mikrotubulusschaft, hierdurch kann es Mikrotubuli untereinander vernetzen, aber auch eine Verbindung der Mikrotubuli mit Intermediärfilamenten herstellen. In nicht-neuronalen Zellen übernehmen MAP4 oder Tau-Proteine Funktionen der Mikrotubulistabilisation und Vernetzung mit anderen zytoskelettalen Komponenten (Dehmelt and Halpain, 2005; Bloom and Vallee, 1983). Diese Proteinfamilie wird oftmals durch Phosphorylierung reguliert (Illenberger *et al.*, 1996). Das

Wachstum der Mikrotubuli und die Verbindung zum zellulären Kortex werden durch eine spezielle MAP-Familie reguliert, den sogenannten +TIPs (*plus-end tracking proteins*). Hierzu zählen zum Beispiel EB1-3 (*endbinding proteins 1-3*), CLIP170 (*cytoplasmic linker protein 170*), CLASPs (*cytoplasmic linker associated proteins*) und ACF7 (*actin cross linking factor 7*) (Lansbergen and Akhmanova, 2006; Akhmanova and Steinmetz, 2008). +TIPs binden spezifisch an das polymerisierende Ende der Mikrotubuli. Die EBs und CLIP170 bewirken hauptsächlich ein vermehrtes Mikrotubuluswachstum, indem sie die Katastrophenfrequenz herabsetzen und so die Wachstumsphasen der Mikrotubuli verlängern. ACF7 verfügt über Mikrotubuli- sowie Aktin-bindende Domänen. Es vermittelt die Polymerisation der Mikrotubuli entlang von Aktinfilamenten sowie das sogenannte *capturing* der Mikrotubuli am kortikalen Aktin (Wu *et al.*, 2011). Destabilisierend auf das Mikrotubulizytoskelett wirken unter anderem Proteine wie Spastin und Katanin (Lindeboom *et al.*, 2013; Salinas *et al.*, 2007), die Mikrotubulifilamente durchtrennen können. Die Proteine, die sich hauptsächlich an der Destabilisierung der Mikrotubuli beteiligen, sind die unbeweglichen Kinesine der Kinesinfamilie 13. In Säugetieren gehören dazu Kif2A, Kif2B und Kif2C/MCAK (*kinesin family member 2A, 2B, 2C/mitotic centromere-associated kinesin*) (van der Vaart *et al.*, 2009). Ein weiteres wichtiges Mikrotubuli-destabilisierendes Protein ist Stathmin, welche das Mikrotubuliwachstum hemmt, indem es Tubulinheterodimere bindet (Sobel, 1991; Steinmetz, 2007).

2.3.3. Das Septinzytoskelett

Septine sind GTPasen unterschiedlicher Masse (30-65 kDa), die zur Überfamilie der p-loop (*phosphate-binding loop*) NTPasen gehören (Leipe *et al.*, 2002). In Säugetieren sind 13 verschiedene Septine bekannt, Septin 1-12 und Septin 14. Sie lassen sich aufgrund von Sequenzhomologien in vier verschiedene Gruppen unterteilen (SEPT2, 3, 6 und 7) (Spiliotis and Gladfelter, 2012). Einen Überblick gibt Tabelle 2. Die Gruppen unterscheiden sich untereinander maßgeblich in der Sequenz und Länge ihrer am Amino-Terminus gelegenen Prolin-reichen Domäne und der am Carboxy-Terminus gelegenen Coiled-coil Domäne. Ansonsten besitzen sie drei unter den verschiedenen Gruppen konservierte Domänen: Eine polybasische Region, eine GTPase-Domäne und die SUE-Domäne (*septin unique element*). Die polybasische Region, die N-terminal von der zentralen GTPase-Domäne liegt, bindet Phosphoinositide und vermittelt die Bindung von Septinen an die Plasmamembran (Casamayor and Snyder, 2003; Zhang *et al.*, 1999). Die GTPase-Domäne bildet eine Interaktionsfläche zwischen den Septinen. Septine der Gruppe SEPT6 haben die Fähigkeit der GTP-Hydrolyse verloren. Hinter der GTPase-Domäne liegt C-terminal die SUE-Domäne, die

an der Bildung einer weiteren Septin-Septin-Interaktionsfläche beteiligt ist (Mostowy and Cossart, 2012). Die Domänenstruktur der Septine ist in Abbildung 11 schematisch dargestellt.

Die zelluläre Funktion der Septine besteht in ihrer Eigenschaft Oligomere zu bilden, die höher geordnete Strukturen wie zum Beispiel Filamente, Netze oder Ringe ausbilden können (Spiliotis and Gladfelter, 2012). Abbildung 12 zeigt schematisch den Aufbau dieser Strukturen. In Säugetierzellen geht man von heterotrimeren Hexameren als Grundbaustein der Septinfilamente aus. Diese setzen sich aus Septinen der Gruppen SEPT2, SEPT6 und SEPT7 zusammen (SEPT7-SEPT6-SEPT2-SEPT2-SEPT6-SEPT7). Auch heterotetramere Oktamere, die aus Septinen der Gruppen SEPT2, SEPT3, SEPT6 und SEPT7 bestehen (SEPT3-SEPT7-SEPT6-SEPT2-SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT3), wurden als Grundbaustein für Septinfilamente in Säugetierzellen beschrieben. Ob das Septinzytoskelett verschiedener Zelltypen aus hexa- oder oktameren Grundbausteinen besteht, soll insbesondere durch die Expression von Septinmonomeren der SEPT3-Gruppe reguliert werden (Sellin *et al.*, 2014; Sellin *et al.*, 2011b). Die Rolle der Nukleotid-Bindung und -Hydrolyse bei der Polymerisation der Septine ist im Gegensatz zu Aktin und Tubulin nicht genau geklärt. Einige Untersuchungen weisen auf die Bedeutung der GTP-Bindung für die Filamentbildung hin (Sirajuddin *et al.*, 2009; Mendoza *et al.*, 2002). Viele Septine werden gewebespezifisch exprimiert, so zum Beispiel Septin 3, das nur im ZNS exprimiert wird, oder Septin 12, das nur in Lymphozyten und Hodengewebe zu finden ist. Ubiquitär exprimiert werden Septin 2, 5, 6, 7, 9, 10 und 11. Septin 7 stellt das einzige Mitglied seiner Gruppe dar und ist unverzichtbar für die Filamentbildung.

Ursprünglich beschrieben wurden Septine in Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*), wo sie 1971 in Mutageneseexperimenten als Gene identifiziert wurden, die essenziell für die Sprossung und Zytokinese sind (Hartwell, 1971). Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen beobachtete man 1976 in der Teilungsfurche von Hefen 10 nm große Ringe, die 1987 als Septine identifiziert wurden (Byers and Goetsch, 1976; Haarer and Pringle, 1987). Inzwischen ist klar, dass zahlreiche Prozesse eukaryoter Zellen von Septinen abhängig sind. Dazu gehören unter anderem die Zellpolarisierung, Zytokinese, Exozytose, Phagozytose, Ziliogenese und die Zellmotilität (Beise and Trimble, 2011). Die Hauptfunktion der Septinfilamente wird in der Kontrolle der Zellmorphologie gesehen, vor allem in der Modulation der Plasmamembran und der Regulation des Aktin- und Mikrotubulizytoskeletts (Spiliotis and Gladfelter, 2012). An die Plasmamembran gebundene Septinfilamente erfüllen verschiedene Funktionen. Zum einen erhöhen sie die Festigkeit der Plasmamembran (Mostowy *et al.*, 2011; Tooley *et al.*, 2009) und bilden Diffusionsbarrieren, wodurch sie die

Plasmamembran kompartimentalisieren (Takizawa *et al.*, 2000; Barral *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2010). Zum anderen bewirken sie Membranverformungen, was in ihrer Eigenschaft begründet ist, gekrümmte und runde Filamente zu bilden (Kinoshita *et al.*, 2002; Sirajuddin *et al.*, 2007; Tanaka-Takiguchi *et al.*, 2009).

2.3.3.1. Regulation des Septinzytoskeletts

Bis heute ist nur wenig über die Regulation und die Wechselwirkungen der Septine mit den anderen zytoskelettalen Komponenten bekannt (Spiliotis and Gladfelter, 2012). Die ersten Hinweise auf Septin-regulierende Mechanismen stammen aus Experimenten mit *S. cerevisiae*. Hier zeigten Studien, dass Rho-GTPasen wie zum Beispiel CDC42p und CDC42p-aktivierende Proteine eine entscheidende Rolle bei der Bildung des Septinrings in der Teilungsfurche spielen (Gladfelter *et al.*, 2002; Caviston *et al.*, 2003). Elektronenmikroskopische Untersuchungen rekombinanter Septinfilamente aus *S. cerevisiae* konnten zeigen, dass das CDC42p-Effektorprotein Gic1 (*GTPase interactive component 1*) und CDC42p direkt mit den Septinfilamenten interagieren und die Septinpolymerisation induzieren sowie stabilisieren (Sadian *et al.*, 2013). Offenbar haben orthologe Proteine im Säugetierorganismus ähnliche Funktionen. So wurde gezeigt, dass die CDC42-Effektoren BORG1-3 (*binding of Rho-GTPases 1-3*), die die Säugetier-Orthologe zu Gic1 darstellen, ebenfalls mit Septinen interagieren. Ein regulativer Einfluss von CDC42 auf das Septinzytoskelett in Säugetierzellen wurde dementsprechend beobachtet (Joberty *et al.*, 2001; Sheffield *et al.*, 2003). Posttranslationale Modifikationen der Septine wie Phosphorylierung oder SUMOylierung haben anscheinend auch einen regulatorischen Einfluss auf die Filamentbildung (McMurray and Thorner, 2009; Garcia *et al.*, 2011).

Tabelle 2: Übersicht der verschiedenen Septingruppen und ihrer Mitglieder, die in Säugetieren gefunden wurden.

Gruppe	Mitglieder
SEPT2	Septin 1, 2, 4, 5
SEPT3	Septin 3, 9, 12
SEPT6	Septin 6, 8, 10, 11, 14
SEPT7	Septin 7



Abbildung 11: Schematische Darstellung der Domänenstruktur der Septinmonomere. Die 13 bekannten Septine in Säugetierzellen unterscheiden sich in Länge und Sequenz ihrer N-terminal gelegenen Prolin-reichen Domäne und der C-terminal gelegenen Coiled-coil Domäne. Eine hohe Sequenzidentität (mindestens 70 %) zwischen den verschiedenen Septinen besteht in den zentral gelegenen Domänen: Der polybasischen Region, der GTP-bindenden Domäne und der SUE-Domäne (*septin unique element*). Die Funktionen der Domänen sind im Text erläutert. Modifiziert nach Mostowy und Cossart, 2013.

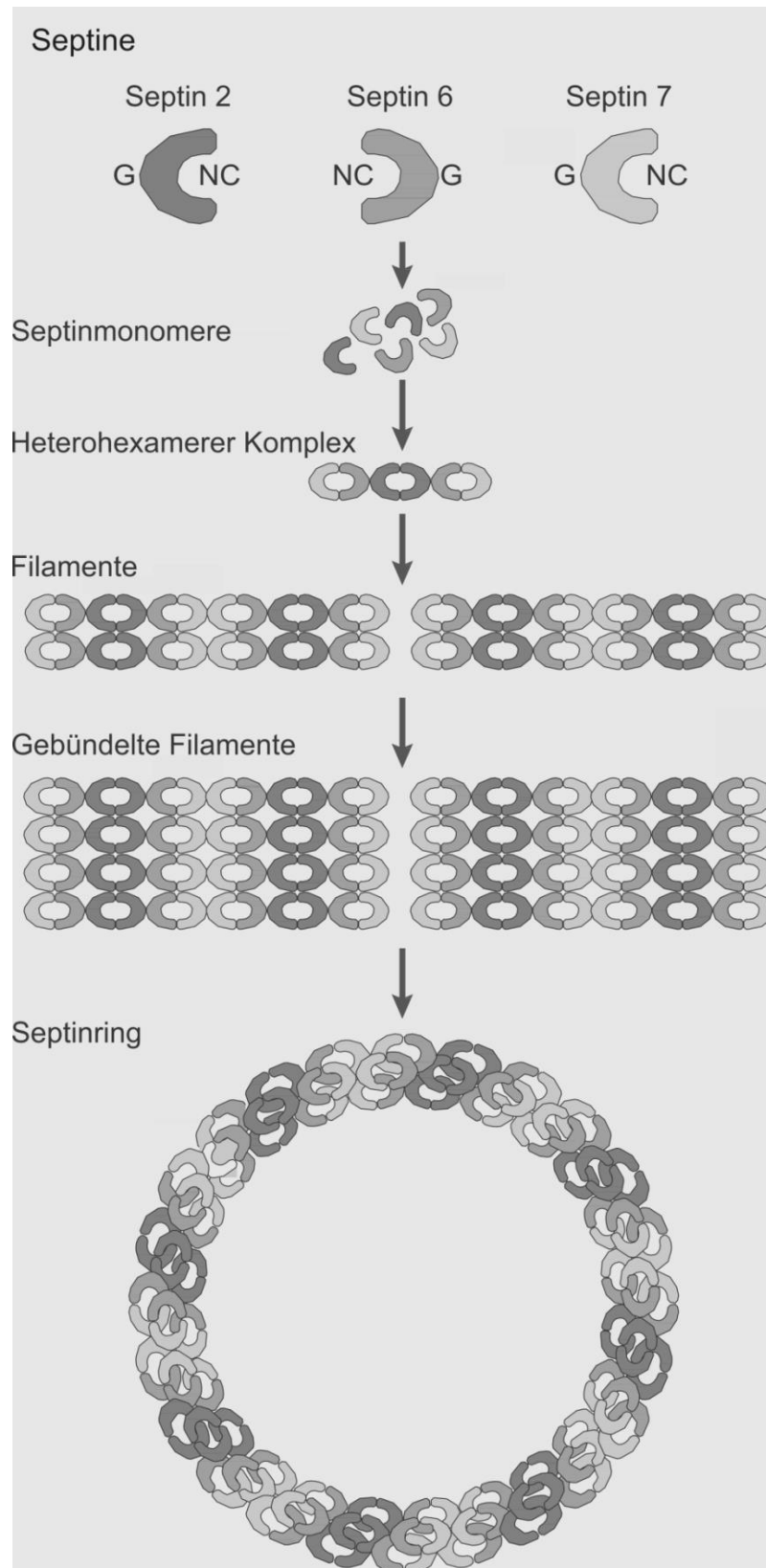


Abbildung 12: Schematische Darstellung des Grundaufbaus des Septinzytoskeletts. Septine sind GTP-bindende Proteine, die sich untereinander mit ihrer GTP-bindenden Domäne (G) und ihrer N- und C-terminalen Interaktionsfläche (NC) zu heterohexameren Oligomeren und anderen heteromeren Oligomeren verbinden können. Dargestellt sind die Septine 2, 6, und 7, von denen man annimmt, dass sie das Grundgerüst der Septinfilamente in Säugetierzellen bilden. Die heterohexameren Komplexe bilden die Grundbausteine und polymerisieren zu unpolaren Filamenten, die wiederum gebündelt werden und Septinstrukturen von unterschiedlicher Morphologie aufbauen können. Dargestellt ist hier ein Septinring. Modifiziert nach Mostowy und Cossart, 2013.

2.3.4. Intermediärfilamente

Schließlich gehören Intermediärfilamente zu den zytoskelettalen Komponenten. Hierbei handelt es sich um circa 11 nm dicke unpolare Filamente, die sich zwischen Desmosomen und Hemidesmosomen der Zelle aufspannen oder die Innenmembran des Zellkerns auskleiden. Sie verleihen Zellen und Zellverbänden Festigkeit. Zu den bekanntesten Vertretern gehören die Zytokeratine in Epithelgeweben oder Vimentin in Zelltypen mesenchymaler Herkunft. Da in der vorliegenden Arbeit keine Untersuchungen zu Intermediärfilamenten durchgeführt wurden, wird hier nicht weiter auf sie eingegangen.

2.4. Die Plasmamembran

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion der Plasmamembranzusammensetzung bei der Bildung CDT-induzierter Zellausläufer untersucht. Deswegen wird im Folgenden auf ihre Bestandteile und Organisation näher eingegangen. Die Plasmamembran besteht aus einer etwa 5 nm dicken Lipiddoppelschicht, die sich aus verschiedenen amphipatischen Lipiden zusammensetzt. Den Hauptanteil der Plasmamembranlipide bilden sogenannte Phospholipide. Die polaren Anteile der Phospholipide richten sich nach außen hin zur wässrigen Umgebung aus, sodass die unpolaren Lipidbestandteile ins Innere der Doppelschicht ragen (Tanford, 1978). In der Lipiddoppelschicht eingelagert finden sich zahlreiche integrale Membranproteine und mit sogenannten Lipidankern fixierte membranständige Proteine, die häufig durch verzweigte Kohlenhydratketten modifiziert sind. Solche Kohlenhydratketten finden sich ebenfalls an verschiedenen Membranlipiden. Protein- und Kohlenhydratstrukturen dienen oft als Rezeptoren für Signalmoleküle aus dem extrazellulären Raum und der Signaltransduktion ins Zellinnere (Lingwood and Simons, 2010). In der Membran sind die einzelnen Bestandteile gegeneinander verschiebbar und prinzipiell frei beweglich. Hier spricht man vom sogenannten Flüssig-Mosaik-Modell der Plasmamembran (Singer and Nicolson, 1972). Den schematischen Aufbau der Plasmamembran und ihre typischen Komponenten zeigt Abbildung 13.

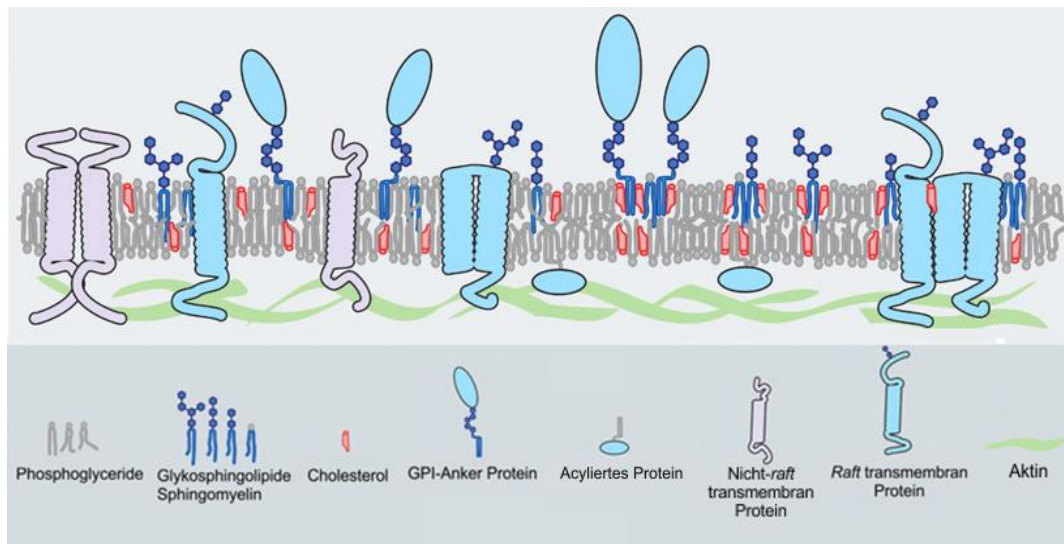


Abbildung 13: Schematischer Aufbau und einzelne Komponenten der Plasmamembran. Hauptbestandteile der Lipiddoppelschicht sind Phosphoglyceride (grau) und Sphingolipide (blau), die sich in der äußeren Schicht der Membran befinden. Cholesterol (rot), das sich zwischen die Phospholipide in die äußere und innere Schicht der Membran einlagert, stellt ebenfalls einen Hauptbestandteil der Plasmamembran dar. Zusätzlich dargestellt sind verschiedene Kategorien von Membranproteinen und das kortikale Aktinzytoskelett (grün), das durch seine Verbindung zu Membranproteinen eine versteifende Membranunterlage bildet. Modifiziert nach Lingwood und Simons, 2010.

2.4.1. Verschiedene Lipide der Plasmamembran

Den Hauptbestandteil der Plasmamembranlipide von Säugetierzellen machen Phosphoglyceride aus (Pankov *et al.*, 2006). Dabei handelt es sich um Phospholipide, die den dreiwertigen Alkohol Glycerol als Grundbaustein besitzen. An ihm sind zwei Fettsäuren von unterschiedlicher Länge und Sättigungsgrad verestert und auch eine Phosphatgruppe gebunden. Das einfachste Phosphoglycerid ist die Phosphatidsäure, die lediglich aus dem beschriebenen Grundgerüst besteht. An dem Phosphatrest der Phosphoglyceride können verschiedene Kopfgruppen gebunden sein. Eine weitere große Lipidgruppe der Plasmamembran stellen die Sphingolipide dar. Sie besitzen den Aminoalkohol Sphingosin als Grundbaustein, an dem eine Fettsäure amidisch gebunden ist. Sie unterteilen sich in Ceramide, Sphingomyeline und Glykosphingolipide. Während Ceramide keine weitere Modifikation aufweisen und sich nur in Länge und Sättigungsgrad ihrer Alkylreste unterscheiden, gehören Sphingomyeline (SM) zu den Phospholipiden, da sie eine Phosphocholin- oder Phosphoethanolamingruppe als Kopfgruppe gebunden haben. Glykosphingolipide besitzen einen glykosidisch gebundenen Kohlenhydratanteil. Neben den Phosphoglyceriden Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylserin (PS) sind Sphingomyeline die am häufigsten vorkommenden Phospholipide in eukaryoten Plasmamembranen (Pankov *et al.*, 2006; Wubbolts *et al.*, 2003). In wässriger Lösung neigen Phospholipide zur spontanen Bildung von Lipiddoppelschichten (Tanford, 1978).

2.4.2. Cholesterol

Cholesterol, das zu den Lipiden der Plasmamembran gezählt wird (Pankov *et al.*, 2006), ist ein polyzyklischer Alkohol mit einem Sterangerüst und einer Alkylseitenkette. Es besitzt amphiphile Eigenschaften, vermag alleine aber keine Membranen auszubilden. Cholesterol lagert sich zwischen die hydrophoben Ketten der Phospholipide der Plasmamembran ein und bildet mit ihnen hydrophobe Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrücken mit ihren polaren Kopfgruppen aus. Durch sein starres und eher planares Sterangerüst lagert es sich in der Plasmamembran bevorzugt mit den längeren und gesättigten Alkylresten der Sphingolipide zusammen (Simons and Vaz, 2004). Cholesterol kommt in ähnlichen Konzentrationen in der Plasmamembran vor wie die häufigsten Phospholipide (PE, PC, PS und SM) und stellt somit einen Hauptbestandteil der Plasmamembran dar (Calderon *et al.*, 1995; Wubbolts *et al.*, 2003). Der Cholesterolgehalt kann je nach Konzentration, Umgebungstemperatur und Lipidzusammensetzung der Plasmamembran die Membranfluidität erhöhen oder senken. Die Temperatur, bei der der Zustand der Plasmamembran von flüssig zu fest übergeht, nennt man Übergangstemperatur. Unterhalb dieser Temperatur verhindert Cholesterol die dichtere Zusammenlagerung der anderen Membranlipide und damit die weitere Verfestigung der Plasmamembran. Oberhalb der Übergangstemperatur behindert es die laterale Diffusion der anderen Membranlipide, wodurch eine weitere Verflüssigung der Membran verhindert wird. So können verschiedene Zelltypen und Organismen durch den Cholesterolgehalt ihrer Plasmamembran deren biophysikalische Eigenschaften modulieren.

2.4.3. Das Modell der *lipid rafts*

Unter *lipid rafts* (auch *detergent resistant membranes* oder *liquid ordered phase*) versteht man ein Organisationsprinzip der Plasmamembran, das auf den biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften des Cholesterols, einzelner Lipidkomponenten und spezieller Proteine der Plasmamembran beruht. Es erweitert das Flüssig-Mosaik-Modell der Plasmamembran um ein lokales und temporäres Ordnungsphänomen (Simons and Ikonen, 1997). Hierbei bilden sich umschriebene Membranbereiche von 1 nm bis 1 µm Größe aus (Jacobson *et al.*, 2007), die reich an Cholesterol, Sphingolipiden, charakteristischen Transmembranproteinen und Lipid-Anker Proteinen sind (Lingwood and Simons, 2010). Als *raft* (englisch für Floß) werden sie bezeichnet, weil sie dem Modell nach innerhalb der Doppellipidschicht lateral frei beweglich sind. Die so entstehenden Membrandomänen dienen verschiedenen Prozessen, die an der Plasmamembran stattfinden. Dazu zählen unter anderem die Endo- und Exozytose sowie die Signaltransduktion. Das starre Sterangerüst des Cholesterols und die oft gesättigten Alkylketten der Sphingolipide lagern sich aus sterischen

Gründen bevorzugt zusammen und bieten so ein hohes Potenzial für die laterale Separation dieser Membranbestandteile (Simons and Vaz, 2004), ein Phänomen, das ursprünglich als Phasenseparation in Modellmembranen beobachtet wurde (Lentz *et al.*, 1980; Ipsen *et al.*, 1987). Ein weiterer Effekt, der für die vorrangige Zusammenlagerung von Cholesterol und Sphingolipiden in der Plasmamembran verantwortlich gemacht wird, ist der sogenannte Regenschirmeffekt (Huang and Feigenson, 1999). Hier geht man von einer energetischen Begünstigung dieser Interaktion aufgrund der geringen polaren Anteile des Cholesterols und der großen polaren Kopfgruppen der Sphingo- und Glykosphingolipide aus, die das Cholesterol in der Membran vor dem umgebenden Wasser abschirmen können. In den so entstehenden Lipiddomänen reichern sich auch charakteristische Membranproteine an, die zu einer weiteren Stabilisierung dieser Membrandomänen beitragen (Lingwood and Simons, 2010). Zum einen bevorzugen einige Transmembranproteine die Interaktion mit Cholesterol und Sphingomyelin durch ihre Transmembrandomänen, zum anderen reichern sich durch Glykosylphosphatidylinositol verankerte Proteine und einige acylierte Proteine in der *raft* Phase der Plasmamembran an. Abbildung 14 zeigt schematisch den Aufbau von *lipid rafts*.

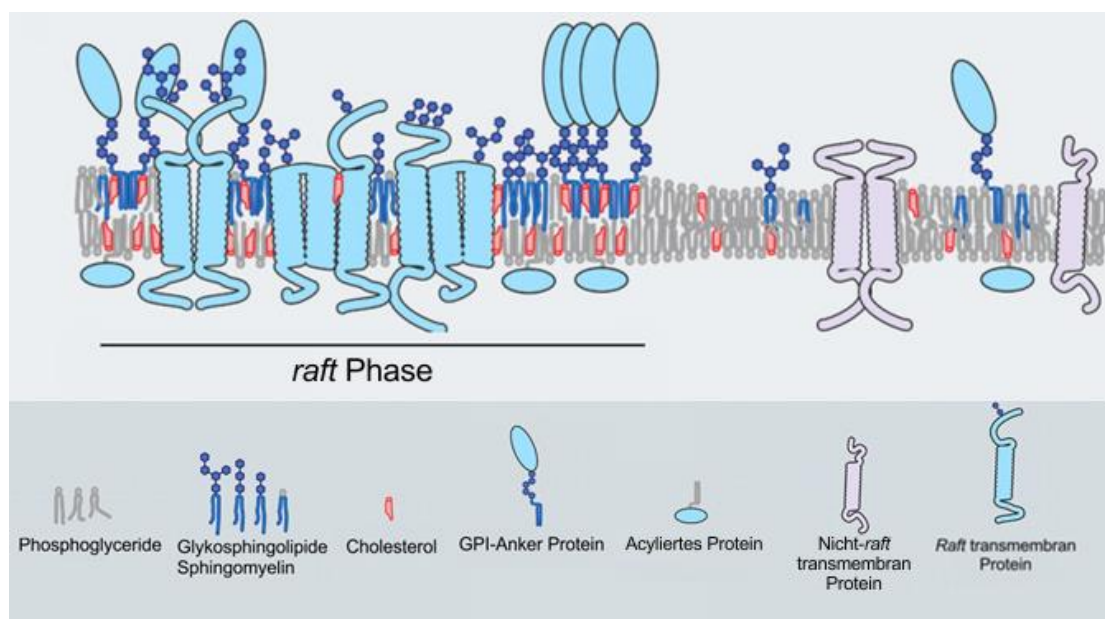


Abbildung 14: Schematische Darstellung eines assoziierten *lipid rafts* und seiner Bestandteile in der Plasmamembran. Verschiedene Membranbestandteile lagern sich zusammen und bilden eine Membrandomäne aus (*raft* Phase). In dieser Domäne angereichert finden sich Cholesterol (rot), Sphingolipide (blau), acylierte Proteine, durch Glykosylphosphatidylinositol verankerte Proteine und bestimmte Transmembranproteine (*raft* transmembran Protein), welche die Assoziation mit den genannten niedermolekularen Membranbestandteilen bevorzugen. Ebenfalls reichern sich Phosphoglyceride mit längeren und gesättigten Alkylresten an. Ausgeschlossen werden nicht-*raft* transmembran Proteine, die die ungeordnete Membranphase bevorzugen, und Phosphoglyceride, die kürzere und ungesättigte Alkylreste haben. Durch die Anreicherung von Membranlipiden mit längeren und gesättigteren Alkylresten verdicken sich die *raft* Phasen der Membran. Modifiziert nach Lingwood und Simons, 2010.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Material

3.1.1. Bakterienstämme und Nährlösungen

3.1.1.1. *E. coli*-Stämme zur Expression und Amplifizierung von Plasmid-DNA

***Escherichia coli* BL21** (Stratagene, La Jolla, CA, USA)

E. coli B F⁻ dcm ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) gal [malB⁺]_{K-12}(λS)

***Escherichia coli* TG1** (Lucigen, Middleton, WI, USA)

recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]

***Escherichia coli* XL1-Blue** (Stratagene)

recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]

***Escherichia coli* Rosetta** (Novagen, Darmstadt, D)

F⁻ ompT hsdS_B(R_B⁻ m_B⁻) gal dcm λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])
pLysSRARE (Cam^R)

3.1.1.2. *B. megaterium*-Stamm zur Expression von Plasmid-DNA

***Bacillus megaterium* W320** (MoBiTec, Göttingen, D)

lac⁻ xyl⁺

3.1.1.3. Nährlösungen

Tabelle 3: Angaben zur Herstellung von 1 l LB-Nährlösung

Reagenz	Hersteller	Menge
NaCl	Roth (Karlsruhe, D)	10 g
Bacto Trypton	Difco (Augsburg, D)	10 g
Hefeextrakt	Roth	5 g
H ₂ O		1 l

Tabelle 4: Zusammensetzung von SOC-Nährlösung

Reagenz	Hersteller	Endkonzentration
LB-Nährlösung		
MgCl ₂	Roth	10 mM
MgSO ₄	Roth	10 mM
KCl	Roth	2,5 mM
Glukose	Roth	20 mM

3.1.1.4. Antibiotika zur Bakterienkultivierung

Tabelle 5: Zur Bakterienkultivierung verwendete Antibiotika

Substanz	Hersteller	Endkonzentration
Kanamycin	Roth	30 µg/ml
Ampicillin	Roth	100 µg/ml
Tetrazyklin	Sigma (Taufkirchen, D)	100 µg/ml

3.1.1.5. Selektivnährböden

Zur Herstellung von Selektivnährböden wurde LB-Nährlösung mit Agar-Agar, Kobe I (Roth) versetzt (1,5 % m/V). Nach dem Autoklavierprozess und anschließendem Abkühlen auf circa 40°C wurde die Lösung mit den verschiedenen Antibiotika versetzt und in Petrischalen gegossen. Nach dem Aushärten wurden die Nährböden bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

3.1.2. Humane Zelllinien und Kulturmedien

3.1.2.1. Humane Zelllinien

Caco-2 (ATCC, HTB-37) Humane kolorektale Karzinomzelllinie

HCT116 (ATCC, CCL-247) Humane kolorektale Karzinomzelllinie

T84 (ATCC, CCL-248) Humane kolorektale Karzinomzelllinie

HeLa (ATCC, CCL-2) Humane epitheliale Zervix-Karzinomzelllinie

3.1.2.2. Zellkulturmedien und Lösungen

Tabelle 6: Kulturmedium für Caco-2-Zellen

Reagenz	Hersteller	Zusatz
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Biochrom (Berlin, D)	
Fötale Kälberserum	Biochrom	10 %
Nichtessenzielle Aminosäuren	Biochrom	1 %
Natriumpyruvat	Biochrom	1 %
Penicillin/Streptomycin	Gibco (Darmstadt, D)	1 %

Tabelle 7: Kulturmedium für HCT116-Zellen

Reagenz	Hersteller	Zusatz
McCoy's 5A Medium	PAN (Aidenbach, D)	
Fötale Kälberserum	Biochrom	10 %
Penicillin/Streptomycin	Gibco	1 %

Tabelle 8: Kulturmedium für T84-Zellen

Reagenz	Hersteller	Zusatz
Ham's F12/Dulbecco's Modified Eagle Medium	Biochrom	
Fötale Kälberserum	Biochrom	10 %
Penicillin/Streptomycin	Gibco	1 %

Tabelle 9: Kulturmedium für HeLa-Zellen

Reagenz	Hersteller	Zusatz
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Biochrom	
Fötale Kälberserum	Biochrom	10 %
Nichtessenzielle Aminosäuren	Biochrom	1 %
Penicillin/Streptomycin	Gibco	1 %

Tabelle 10: PBS (*phosphate buffered saline*) (pH 7,4)

Reagenz	Hersteller	Endkonzentration
KCl	Roth	2,7 mM
NaCl	Roth	140 mM
KH ₂ PO ₄	Roth	1,5 mM
NaH ₂ PO ₄ xH ₂ O	Roth	8 mM

Tabelle 11: PEI-Lösung (pH 7,4)

Reagenz	Hersteller	Endkonzentration
Polyethylenimin	Sigma	0,1 % (m/V)
H ₂ O		

Tabelle 12: Sonstige in der Zellkultur verwendete Lösungen

Reagenz	Hersteller
Trypsin/EDTA (10x)	Pan Biotech (Aidenbach, D)
Opti-MEM	Life Technologies (Darmstadt, D)
Lipofectamine 2000	Life Technologies

3.1.3. Vektoren

3.1.3.1. Vektoren zur Genexpression in Bakterien

pGEX-4T (GE Healthcare, München, D) Für die heterologe Genexpression in *E. coli*

pHis1522 (MoBiTec) Für die heterologe Genexpression in *B. megaterium*

pET28a (Merck, Darmstadt, D) Für die heterologe Genexpression in *E. coli*

3.1.3.2. Vektoren zur Genexpression in humanen Zelllinien

pEGFP-N1 (Clontech, CA, USA) Für die homologe Genexpression in humanen Zelllinien

pEGFP-C3 (Clontech) Für die homologe Genexpression in humanen Zelllinien

ptdTomato-N1 (Clontech) Für die homologe Genexpression in humanen Zelllinien

pSUPER.retro.gfp+neo (Oligoengine, Seattle, WA, USA) Für die shRNA-Expression

3.1.3.3. Sonstige Vektoren

pCR-Blunt-2-TOPO (Life Technologies) Für die Klonierung von PCR-Produkten

3.1.4. Plasmide

Tabelle 13: Liste der verwendeten Plasmide

Plasmid	Referenz
Septin 2 pEGFP N1	NM_001008491
Septin 6 pEGFP N1	NM_145799
Septin 7 pEGFP N1	NM_001788
Septin 2 ptd Tomato N1	NM_001008491
Septin 6 ptd Tomato N1	NM_145799
Septin 7 ptd Tomato N1	NM_001788
EB1 ptdTomato-N1	NM_012325
EB3 pEGFP-C1	(Stepanova <i>et al.</i> , 2003)
pmRFP_a_tubulin_C1	(Steigemann <i>et al.</i> , 2009)
Tubulin pAcGFP1	Clontech, PT3836-5
<i>lifeact</i> mCherry pIRESpuro3	(Fink <i>et al.</i> , 2011)
pHcRed1-Nuc	Clontech, PT3728-5
shRNA Septin 2 pSUPER.retro.gfp+neo	Zielsequenz aus (Sellin <i>et al.</i> , 2011b)
shRNA Septin 6 pSUPER.retro.gfp+neo	Zielsequenz aus (Sellin <i>et al.</i> , 2011a)
shRNA Septin 7 pSUPER.retro.gfp+neo	Zielsequenz aus (Sellin <i>et al.</i> , 2011b)
shRNA Kontrolle pSUPER.retro.gfp+neo	Zielsequenz aus (Narvekar <i>et al.</i> , 2009)
Septin 2 pET28a	NM_001008491
Septin 6 pET28a	NM_145799
Septin 7 pET28a	NM_001788
EB1 pGEX-4T	NM_012325
C2II pGEX-2T	(Sterthoff <i>et al.</i> , 2010)
C2I pGEX-2T	(Barth <i>et al.</i> , 1998)
CDTa pHis1522	(Papatheodorou <i>et al.</i> , 2011)
CDTb pHis1522	(Papatheodorou <i>et al.</i> , 2011)

3.1.5. Oligonukleotide

Tabelle 14: Liste der verwendeten Oligonukleotide

Name	Sequenz 5'-3'
Septin 2 XhoI fw	CCCCCTCGAGATGTCTAAGCAACAGCCAACTC
Septin 2 HindIII rev	CCCCTTCGAAGTGCACCACGGGCTCTCG
Septin 6 XhoI fw	CCCCCTCGAGATGGCAGCGACCGATATAGC
Septin 6 HindIII rev	CCCCTTCGAATAAAAAGAAGAGAAACAGAGAGAA
Septin 7 XhoI fw	CCCCCTCGAGATGTCGGTCAGTGCGAGATC
Septin 7 HindIII rev	CCCCTTCGAATTTCTAGAAGGGAAAGAAGAACA
Septin 2 EcoRI fw	GGGGGAATTCATGTCTAAGCAACAGCCAACTC
Septin 2 XhoI rev	GGGGGAGCTCAATGTGCACCACGGGCTCTCG
Septin 6 BamHI fw	CCCCGGATCCATGGCAGCGACCGATATAGCTC
Septin 6 XhoI rev	CCCCGAGCTCAATTAAAAAGAAGAGAAACAGAGAG
Septin 7 BamHI fw	CCCCGGATCCATGTCGGTCAGTGCGAGATC
Septin 7 XhoI rev	CCCCGAGCTCAATTTTCTAGAAGGGAAAGAAGAACA
EB1 BamHI fw	GGGGGGATCCATGGCAGTGAACGTATACTC
EB1 XhoI rev	GGGGGAGCTCAATTATGAGAAGAACGAGGAG
EB1 XhoI fw	GGGGCTCGAGATGGCAGTGAACGTATACTC
EB1 HindIII rev	GGGGTTCGAATATGAGAAGAACGAGGAGGA
shRNA Septin 2 fw	GATCCCCCAGCCAACTCAGTTTATAATTCAAGAGATTATAAA CTGAGTTGGCTGTTTTTA
shRNA Septin 2 rev	AGCTTAAAAACAGCCAACTCAGTTTATAATCTCTTGAATTAT AAACTGAGTTGGCTGGGG
shRNA Septin 6 fw	GATCCCCGAGAGACAAAGAGAAGAAATTCAAGAGATTCTT CTCTTTGTCTCTCTTTTTTA
shRNA Septin 6 rev	AGCTTAAAAAGAGAGACAAAGAGAAGAAATCTCTTGAATTT CTTCTCTTTGTCTCTCGGG
shRNA Septin 7 fw	GATCCCCCTTGCAGCTGTGACTTATATTCAAGAGATATAAGT CACAGCTGCAAGTTTTTA
shRNA Septin 7 rev	AGCTTAAAAACTTGCAGCTGTGACTTATATCTCTTGAATATA AGTCACAGCTGCAAGGGG
shRNA Kontrolle fw	GATCCCCGATCTGATCGACACTGTAATTCAAGAGATTACAGT GTCGATCAGSTCTTTTT
shRNA Kontrolle rev	AGCTAAAAAGATCTGATCGACACTGTAATCTCTTGAATTACA GTGTCGATCAGATCGGGG

3.1.6. Antikörper

Tabelle 15: Liste der verwendeten primären und sekundären Antikörper

Antigen/Konjugat	Spezies	Hersteller	Verdünnung Immunzytochemie	Verdünnung Immunoblot
Tubulin	Maus	Sigma (St.Louis, MO, USA)	1:3000	1:8000
Rab5	Kaninchen	Santa Cruz (Dallas, TX, USA)	1:200	
Flotillin 2	Kaninchen	Santa Cruz	1:200	
Septin 2	Kaninchen	Sigma	1:2000	1:4000
Septin 6	Kaninchen	Santa Cruz	1:500	1:1000
Septin 7	Kaninchen	Santa Cruz	1:500	1:1000
LSR	Kaninchen	Santa Cruz	1:300	
GAPDH	Maus	Millipore (Darmstadt, D)		1:20000
IgG Kaninchen/HRP	Ziege	New England Biolabs (Schwalbach, D)		1:2000
IgG Maus/HRP	Ziege	Santa Cruz		1:3000
IgG Maus/Alexa 647	Ziege	Life Technologies	1:200	
IgG Maus/Alexa 488	Ziege	Life Technologies	1:200	
IgG Maus/Alexa 568	Ziege	Life Technologies	1:200	
IgG Kaninchen /Alexa 488	Ziege	Life Technologies	1:200	
IgG Kaninchen /Alexa 568	Ziege	Life Technologies	1:200	

3.1.7. Chemikalien und Substanzen

3.1.7.1. Lösungen und Puffer

3.1.7.1.1. Puffer für die Agarosegelelektrophorese

Tabelle 16: TAE-Puffer (pH 8,0)

Reagenz	Hersteller	Endkonzentration
TRIS-Acetat	Roth	40 mM
EDTA	Roth	1 mM

Tabelle 17: Agarosegelzusammensetzung (Angaben für ein 0,8 %iges Gel)

Reagenz	Hersteller	Menge
TAE-Puffer		60 ml
Agarose	Bioline (Luckenwalde, D)	480 mg

Tabelle 18: DNA-Ladepuffer (6x)

Reagenz	Hersteller	Endkonzentration
Bromphenolblau	Roth	0,25 % (m/V)
Saccharose	Roth	40 % (m/V)

3.1.7.1.2. Puffer für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Tabelle 19: Acrylamidgelzusammensetzung (Angaben für 12 Gele von 1 mm Stärke)

Reagenz	Hersteller	Konzentration	Volumen	Konzentration	Volumen
		Trenngel (12,5 %)		Sammelgel (7 %)	
H ₂ O			4,8 ml		20,2 ml
Acrylamid	Roth	30 %	31,3 ml	30 %	5,65 ml
TRIS-HCl (pH 8,8)	Roth	0,75 M	37,5 ml	0,625 M	6,5 ml
Natriumdodecylsulfat	Roth	20 %	375 µl	20 %	150 µl
Ammonium-peroxodisulfat	Roth	10 %	750 µl	10 %	300 µl
N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin	Roth	10 %	300 µl	10 %	300 µl

Tabelle 20: Lämmli-Probenpuffer (5x)

Reagenz	Hersteller	Endkonzentration
TRIS-HCl (pH 6,8)	Roth	100 mM
Natriumdodecylsulfat	Roth	10 % (m/V)
Glycerol	Roth	34 %
Bromphenolblau	Roth	0,25 % (m/V)
Dithiothreitol	Roth	100 mM

Tabelle 21: SDS-Laufpuffer

Reagenz	Hersteller	Endkonzentration
TRIS-HCl (pH 6,8)	Roth	25 mM
Natriumdodecylsulfat	Roth	1 g/l
Glycin	Applichem (Darmstadt, D)	190 mM

3.1.7.1.3. Puffer für die Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Tabelle 22: Lysispuffer (pH 8,5)

Reagenz	Hersteller	Endkonzentration
NaCl	Roth	50 mM
TRIS-HCl	Roth	50 mM
DNase I	Roche Diagnostics (Basel, Schweiz)	5 µg/ml
Lysozym	Roth	1 mg/ml
Complete	Roche Diagnostics	1 Tablette/50 ml

Tabelle 23: Waschpuffer (pH 8,5)

Reagenz	Hersteller	Endkonzentration
NaCl	Roth	150 mM
TRIS-HCl	Roth	50 mM
Tween-20	Sigma	0,05 %
Dithiothreitol	Roth	2 mM

Tabelle 24: Elutionspuffer (pH 8,0)

Reagenz	Hersteller	Endkonzentration
Glutathion	Sigma	20 mM
TRIS-HCl	Roth	50 mM

Tabelle 25: Thrombinspaltpuffer (pH 7,5)

Reagenz	Hersteller	Endkonzentration
NaCl	Roth	50 mM
TRIS-HCl	Roth	50 mM
CaCl ₂	Roth	2,5 mM

Tabelle 26: Dialysepuffer (pH 7,4)

Reagenz	Hersteller	Endkonzentration
NaCl	Roth	150 mM
TRIS-HCl	Roth	20 mM
Glycerol	Roth	5 % (V/V)

3.1.7.1.4. Puffer für die Aufreinigung von 6xHistidin-Fusionsproteinen

Tabelle 27: Lysispuffer (pH 8,0)

Reagenz	Hersteller	Endkonzentration
NaCl	Roth	300 mM
EDTA	Sigma	0,5 mM
TRIS-HCl	Roth	200 mM
Imidazol	Roth	20 mM
DNase I	Roche Diagnostics	5 µg/ml
Complete	Roche Diagnostics	1 Tablette/50 ml

Tabelle 28: Waschpuffer (pH 8,0)

Reagenz	Hersteller	Endkonzentration
NaCl	Roth	300 mM
TRIS-HCl	Roth	20 mM
Imidazol	Roth	20 mM

Tabelle 29: Elutionspuffer (pH 8,0)

Reagenz	Hersteller	Endkonzentration
NaCl	Roth	300 mM
TRIS-HCl	Roth	20 mM
Imidazol	Roth	500 mM

Tabelle 30: Dialysepuffer (pH 7,4)

Reagenz	Hersteller	Endkonzentration
NaCl	Roth	150 mM
TRIS-HCl	Roth	20 mM
Glycerol	Roth	5 % (V/V)

3.1.7.1.5. Puffer für ADP-Nachribosylierungsexperimente

Tabelle 31: ADP-Ribosylierungspuffer (pH 7,4)

Reagenz	Hersteller	Endkonzentration
TRIS-HCl	Roth	20 mM
EDTA	Roth	1 mM
MgCl ₂	Roth	5 mM
Dithiothreitol	Roth	1 mM
Complete	Roche Diagnostics	1 Tablette/50 ml

3.1.7.1.6. Puffer für immunzytochemische Untersuchungen

Tabelle 32: PBS (pH 7,4)

Reagenz	Hersteller	Endkonzentration
KCl	Roth	2,7 mM
NaCl	Roth	140 mM
KH ₂ PO ₄	Roth	1,5 mM
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	Roth	8 mM

Tabelle 33: Fixierlösung (pH 7,4)

Reagenz	Hersteller	Endkonzentration
PBS		
Paraformaldehyd	Roth	4 % (m/V)

Tabelle 34: PBS-Tween (pH 7,4)

Reagenz	Hersteller	Endkonzentration
PBS		
Tween-20	Sigma	0,05 % (V/V)

Tabelle 35: Blockierlösung (pH 7,4)

Reagenz	Hersteller	Endkonzentration
PBS-Tween		
Bovines Serumalbumin Fraktion V	Roth	1 % (m/V)

Tabelle 36: Permeabilisationslösung (pH 7,4)

Reagenz	Hersteller	Endkonzentration
PBS		
Triton X-100	Sigma	0,15 % (V/V)

Tabelle 37: Eindeckmedium (Angaben für circa 26 g)

Reagenz	Hersteller	Menge
Glycerol	Roth	6 g
Mowiol 4-88	Sigma	2 g
TRIS-HCl (0,2 M, pH 8,5)		12 ml
H ₂ O		6 ml
DAPI	Sigma	10 µg
1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan	Sigma	650 µg

3.1.7.1.7. Puffer für Immunoblot-Verfahren

Tabelle 38: TBS-Tween (*tris buffered saline*) (pH 7,4)

Reagenz	Hersteller	Endkonzentration
TRIS-HCl	Roth	20 mM
NaCl	Roth	150 mM
Tween-20	Sigma	0,05 % (V/V)

Tabelle 39: Blockierlösung (pH 7,4)

Reagenz	Hersteller	Endkonzentration
TBS-Tween		
Milchpulver	Roth	5 % (m/V)

Tabelle 40: Blotpuffer (pH 7,4)

Reagenz	Hersteller	Endkonzentration
Methanol	Roth	20% (V/V)
TRIS-HCl	Roth	24 mM
Glycin	Applichem	190 mM

Tabelle 41: ECL-1 (pH 8,0)

Reagenz	Hersteller	Endkonzentration
TRIS-HCl	Roth	100 mM
Luminol	Roth	2,5 mM
p-Cumarsäure	Roth	0,4 mM

Tabelle 42: ECL-2 (pH 8,0)

Reagenz	Hersteller	Endkonzentration
TRIS-HCl	Roth	100 mM
H ₂ O ₂	Roth	150 mM

3.1.7.1.8. Puffer für Pulldown-Experimente

Tabelle 43: GST-fish Puffer (pH 7,4)

Reagenz	Hersteller	Endkonzentration
TRIS-HCl	Roth	20 mM
NaCl	Roth	100 mM
MgCl ₂	Roth	2 mM
Glycerol	Roth	10 % (V/V)
IGEPAL	Sigma	1 % (V/V)
Complete	Roche Diagnostics	1 Tablette/50 ml

Tabelle 44: Hochsalzpuffer (pH 7,4)

Reagenz	Hersteller	Endkonzentration
TRIS-HCl	Roth	20 mM
NaCl	Roth	500 mM

3.1.7.1.9. Puffer für Mikrotubuli-Spindown-Experimente

Tabelle 45: *General-Tubulin-Buffer* (pH 7,0) (Cytoskeleton, Inc., Denver, CO, USA)

Reagenz	Endkonzentration
PIPES	80 mM
MgCl ₂	2 mM
EGTA	0,2 mM

Tabelle 46: *Cushion-Buffer* (pH 7,0) (Cytoskeleton)

Reagenz	Endkonzentration
PIPES	80 mM
MgCl ₂	1 mM
EGTA	1 mM
Glycerol	60 % (m/V)

3.1.7.1.10. Puffer für Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie

Tabelle 47: Laufpuffer (pH 7,4)

Reagenz	Hersteller	Endkonzentration
NaCl	Roth	150 mM
HEPES	Roth	10 mM
Tween	Sigma	0,01 % (V/V)

Tabelle 48: Nickel(II)-sulfat Lösung (pH 7,4)

Reagenz	Hersteller	Endkonzentration
Laufpuffer		
NiSO ₄	Roth	500 µM

Tabelle 49: Waschlösung (pH 7,4)

Reagenz	Hersteller	Endkonzentration
Laufpuffer		
EDTA	Roth	3 mM

3.1.7.1.11. Puffer zur Cholesteroldepletion der Plasmamembran

Tabelle 50: Cholesteroldepletionspuffer (pH 7,4)

Reagenz	Hersteller	Endkonzentration
NaCl	Roth	150 mM
KCl	Roth	4 mM
Glukose	Roth	11 mM
HEPES	Roth	10 mM

3.1.7.1.12. DNA-Hybridisierungspuffer

Tabelle 51: DNA-Hybridisierungspuffer (pH 8,0)

Reagenz	Hersteller	Endkonzentration
TRIS-HCl	Roth	100 mM
NaCl	Roth	50 mM
EDTA	Roth	1 mM

3.1.7.1.13. Coomassie-Färbelösung

Tabelle 52: Coomassie-Färbelösung

Reagenz	Hersteller	Endkonzentration
Coomassie Brilliant Blue R250	Sigma	0,25 % (m/V)
Methanol	Roth	45,4 % (V/V)
Essigsäure	Roth	9,2 % (V/V)

3.1.7.1.14. Entfärbelösung

Tabelle 53: Entfärbelösung

Reagenz	Hersteller	Endkonzentration
Methanol	Roth	5 % (V/V)
Essigsäure	Roth	7,5 % (V/V)

3.1.7.1.15. Ponceau-Färbelösung

Tabelle 54: Ponceau-Färbelösung

Reagenz	Hersteller	Endkonzentration
Ponceau S	AppliChem	0,2 % (m/V)
Essigsäure	Roth	1 % (V/V)

3.1.7.1.16. Zelllysispuffer

Tabelle 55: Zelllysispuffer (pH 7,4)

Reagenz	Hersteller	Endkonzentration
TRIS-HCl	Roth	50 mM
NaCl	Roth	150 mM
Natriumdodecylsulfat	Roth	0,1 %
Natriumdesoxycholat	VWR (Darmstadt, D)	0,5 %
IGEPAL	Sigma	1 %
Complete	Roche Diagnostics	1 Tablette/50 ml

3.1.7.2. Enzyme

3.1.7.2.1. DNA-modifizierende Enzyme

Tabelle 56: Liste der verwendeten DNA-modifizierenden Enzyme

Enzymname	Hersteller
T4 DNA-Ligase	Thermo Scientific (Schwerte, D)
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs
Pfu-Ultra Fusion HS II DNA-Polymerase	Stratagene
Phusion DNA-Polymerase	New England Biolabs
XhoI Restriktionsendonuklease	Thermo Scientific
HindIII Restriktionsendonuklease	Thermo Scientific
BamHI Restriktionsendonuklease	Thermo Scientific
BglII Restriktionsendonuklease	Thermo Scientific
Sall Restriktionsendonuklease	Thermo Scientific
EcoRI Restriktionsendonuklease	Thermo Scientific

3.1.7.2.2. Sonstige Enzyme

Tabelle 57: Liste der sonstigen verwendeten Enzyme

Enzymname	Hersteller
DNase I	Roche Diagnostics
Sphingomyelinase	Sigma
Trypsin	Sigma
Thrombin	Sigma
Lysozym	Roth

3.1.7.3. DNA- und Proteinstandards

PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific)

10–15–25–35–40–55–70–100–130–170 kDa

peqGOLD Protein-Marker I (Peqlab, Erlangen, D)

14,4–18,4–25–35–45–66,2–116 kDa

GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific)

0,25–0,5–0,75–1–1,5–2–2,5–3–3,5–4–5–6–8–10 kbp

3.1.7.4. Radionuklide

[³²P]NAD (500 µCi/mmol) (Perkin Elmer, Boston, MA, USA)

3.1.7.5. Fluorophor-Konjugate

Tabelle 58: Liste der verwendeten Fluorophor-Konjugate

Reagenz	Hersteller
Phalloidin-Tetramethylrhodamin	Sigma
Cholera-Toxin-B-Untereinheit-Fluoresceinisothiocyanat	Sigma
Alexa Fluor 568 C ₅ Maleimid	Life Technologies

3.1.7.6. Kits

Tabelle 59: Liste der verwendeten Kits

Kit	Hersteller
<i>Zymoclean Gel DNA Recovery Kit</i>	Zymo Research (Freiburg, D)
<i>QIAquick PCR Purification Kit</i>	(Qiagen, Hilden, D)
<i>JetStar Plasmid Purification Kit 2.0</i>	Genomed (Löhne, D)
Roti-Prep Plasmid MINI Kit	Roth
<i>CellTiter-Blue Cell Viability Assay</i>	Promega (Madison, WI, USA)
<i>Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit</i>	Life Technologies

3.1.7.7. Sonstige Chemikalien und Materialien

Tabelle 60: Liste der sonstigen verwendeten Chemikalien und Materialien

Chemikalie/Material	Hersteller
Methyl- β -Cyclodextrin	Sigma
Cholesterol-Methyl- β -Cyclodextrin	Sigma
Nystatin	Sigma
Benzylalkohol	Roth
Myriocin	Sigma
Isopropylthiogalaktosid	Roth
Filipin	Sigma
Dimethylsulfoxid	Sigma
Bradford Roti Quant	Roth
Trypsininhibitor	Sigma
Ethanol	Roth
Forchlorfenuron	Sigma
Midori Green Advance	Biozym (Hessisch Oldendorf, D)
Nukleotide	Roche Diagnostics
Ni ²⁺ -IDA-Protino-Resin	Macherey-Nagel (Düren, D)
Glutathion-Sepharose 4B	GE Healthcare
Benzamidin-Sepharose 6B	GE Healthcare
Polyvinylidenfluorid-Transfermembran	Roth
PD-10 Entsalzungssäulen	GE Healthcare
PD-10 Säulen	VWR
Konzentrator Vivaspin 6 ml	VWR
<i>Human Brain, whole Marathon Ready</i> cDNA	BD Biosciences (Heidelberg, D)
Aktin, > 95 % rein, aus humanen Thrombozyten	Cytoskeleton
Blottingpapier	Roth
Zellschaber, 25 cm	Greiner (Frickenhäusen, D)
Petrischalen, 9,4 cm Ø	Greiner
Deckgläschen, 10 mm Ø	Zitt-Thoma (Freiburg, D)
Objektträger	Roth
D-Xylose	Sigma
Glasbodenschalen, 3 cm Ø	Mattek (Ashland, MA, USA)
Guanidiniumchlorid	Roth
Tubulin, > 99 % rein, aus Rinderhirn	Cytoskeleton
GTP	Cytoskeleton
Taxol	Cytoskeleton

3.2. Methoden

3.2.1. Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1. Agarosegelelektrophorese

Mittels Agarosegelelektrophorese lassen sich DNA-Fragmente ihrer Länge nach in einem Agarosegel auftrennen. Durch die negativen Ladungen ihrer Phosphatreste migriert DNA bei anliegender Spannung zur Anode der Elektrophoresevorrichtung, wobei kürzere DNA-Fragmente schneller migrieren. So lassen sich DNA-Lösungen mittels mitgeführter DNA-Größen- und Mengenstandards qualitativ und quantitativ analysieren. In der vorliegenden Arbeit wurde DNA nach analytischen Restriktionsansätzen elektrophoretisch aufgetrennt, um nach Ligations- und Transformationsreaktionen aus Einzelklonen zurückgewonnene Plasmid-DNA zu überprüfen. Ebenfalls nach präparativen Restriktionsansätzen oder PCR-Reaktionen wurde die DNA elektrophoretisch aufgetrennt, um DNA-Fragmente spezifischer Größe zu isolieren und die eingesetzten Enzyme und Puffersubstanzen von der DNA zu trennen. Die Gelelektrophorese wurde durchgeführt in 0,8 %igen Agarosegelen bei 100 V konstanter Spannung für circa 30 min. Für die Sichtbarmachung der DNA im Agarosegel wurde bei der Herstellung des Gels der Interkalationsfarbstoff Midori Green Advance (5 µl pro 100 ml Agaroselösung) zugesetzt. Dieser fluoresziert unter UV-Licht und macht so im Gel befindliche DNA sichtbar. Für die Analyse der DNA wurde das Eagle-Eye II Auswertungssystem (Biorad, Berkeley, CA, USA) oder ein Transilluminator (302 nm Lichtwellenlänge) der Firma Bachofer (Reutlingen, D) genutzt.

3.2.1.2. Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Zur Rückgewinnung von DNA aus Agarosegelen nach präparativen Restriktionsansätzen oder nach PCR-Reaktionen wurde das entsprechende DNA-Fragment auf einem Transilluminator identifiziert und mithilfe eines Skalpells aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die DNA wurde aus dem Gelstück mit dem *Zymoclean Gel DNA Recovery Kit* nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

3.2.1.3. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) dient der Amplifizierung von DNA in vitro. Es können hierbei spezifisch DNA-Abschnitte von genomischer DNA, cDNA, Plasmid-DNA oder von anderen PCR-Produkten vermehrt werden, um sie oder ihre

Genprodukte weiter zu untersuchen. Das Prinzip beruht auf einem zyklischen Ablauf verschiedener Reaktionsschritte von unterschiedlicher Dauer und Temperatur, bei denen die Ausgangs-DNA exponentiell vermehrt wird. Der typische PCR-Ansatz enthält Ausgangs-DNA, sequenzspezifische Oligonukleotide, Reaktionspuffer, DNA-abhängige DNA-Polymerase und Nukleotide. Die Reaktion durchläuft mehrere Zyklen, in denen zunächst die Temperatur so stark erhöht wird, dass die doppelsträngige Ausgangs-DNA denaturiert und Einzelstränge vorliegen (Denaturierungsschritt; 95°C bei den hier durchgeführten PCR-Reaktionen). Anschließend wird die Temperatur abgesenkt, bis die spezifisch synthetisierten Oligonukleotide an dem *sense*- und *antisense*-Strang jeweils an Beginn und Ende des zu amplifizierenden Abschnitts binden (Hybridisierungsschritt; 55-63°C für die hier verwendeten Oligonukleotide). Durch Erhöhen der Temperatur auf die Arbeitstemperatur der thermostabilen DNA-Polymerase beginnt die Elongation der Oligonukleotide vom 5'-Ende in Richtung 3'-Ende (Elongationsphase; 72°C für die hier verwendeten DNA-Polymerasen). Nach der Elongationsphase, deren Dauer sich nach der Länge des PCR-Produkts richtet, beginnt erneut der Denaturierungsschritt und der Zyklus beginnt von vorn. Bei den hier durchgeführten PCR-Reaktionen wurden nach initialem Denaturierungsschritt von 10 min bei 95°C 25-30 PCR Zyklen durchgeführt und anschließend eine finale Elongationsreaktion von 10 min Dauer bei 72°C. Für die vorliegende Arbeit wurden Plasmid-DNA und eine humane cDNA-Bibliothek als Ausgangs-DNA verwendet. Die PCR-Reaktionen wurden in einem Thermocycler der Firma Eppendorf (Hamburg, D) durchgeführt (Mastercycler pro).

3.2.1.4. Aufreinigung von PCR-Produkten

Die durch PCR-Reaktionen synthetisierte DNA wurde durch die Benutzung des *QIAquick PCR Purification Kits* nach Angaben des Herstellers von den anderen Bestandteilen des PCR-Ansatzes getrennt.

3.2.1.5. Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration und die Qualität der verwendeten DNA-Aufreinigungen und Präparationen wurden mit einem Nanodrop-Spektrophotometer (Pepqlab, Erlangen, D) UV-photometrisch gemessen. Durch die Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm Lichtwellenlänge kann hierbei die DNA-Konzentration bestimmt werden. Die Reinheit der DNA-Lösung kann anhand der Bestimmung der Absorptionsquotienten OD_{260nm}/OD_{280nm} und OD_{260nm}/OD_{230nm} ermittelt werden. So lassen sich Verunreinigungen der Proben durch Proteine, Kohlenhydrate oder Salze erkennen.

3.2.1.6. Präparation von Plasmid-DNA

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Bakterien erfolgte mittels verschiedener Präparations-Kits. Für die Präparation im analytischen Maßstab (3-6 µg) wurde die Plasmid-DNA aus 5-10 ml *E. coli*-Übernachtskultur mithilfe des Roti-Prep Plasmid MINI Kit nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Im präparativen Maßstab (200-300 µg) wurde Plasmid-DNA mittels *JetStar Plasmid Purification Kit 2.0* aus 100-200 ml *E. coli*-Übernachtskultur nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

3.2.1.7. Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde eine rekombinante T4 DNA-Ligase verwendet. Sie kann eine Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppe von DNA-Strängen herstellen. Eine Ligationsreaktion wurde durchgeführt, um DNA-Fragmente in linearisierte Expressionsvektoren einzufügen. Hierfür wurden zwischen 100-300 ng Plasmid-DNA mit einem fünffachen molaren Überschuss an einzufügendem DNA-Fragment und 10-20 U T4 DNA-Ligase in einem 20 µl Reaktionsansatz mit entsprechendem Reaktionspuffer bei 16°C über Nacht inkubiert. Die Ligationsreaktionen wurden mit dem im Lieferumfang der jeweiligen T4 DNA-Ligase enthaltenen Reaktionspuffer durchgeführt.

3.2.1.8. Transformation von *E. coli*-Bakterien

Um die verwendete Plasmid-DNA oder erhaltene Ligationsprodukte zu amplifizieren, wurden sie in *E. coli*-Bakterien eingebracht, die sie dann unabhängig von ihrem Genom vermehren. Aus den Bakterien kann die DNA dann wie oben beschrieben aufgereinigt werden (Abschnitt 3.2.1.6). Das Einbringen von Plasmid-DNA in Bakterien bezeichnet man als Transformation. Hierbei verwendet man üblicherweise sogenannte kompetente Bakterien, die durch spezielle chemische Behandlung DNA-aufnahmebereiter gemacht wurden. Bei der hier durchgeführten Methode wurde mittels Hitzeschock die DNA-Aufnahmeeffizienz der Bakterien während der Transformation erhöht. Die zunächst bei -80°C gelagerten Bakterien wurden langsam aufgetaut und 100 µl Bakteriensuspension mit 20-100 ng Plasmid-DNA vermischt. Bei der Transformation von Ligationsansätzen wurden 10 µl des Reaktionsgemischs verwendet. Das Bakterien-DNA-Gemisch wurde 30 min auf Eis gehalten, anschließend für 90 s auf 42°C erhitzt und für weitere 2 min auf Eis inkubiert. Das Transformationsgemisch wurde in der Folge mit 250 µl SOC-Nährlösung versetzt und in einem Thermomixer (Thermomixer comfort, Eppendorf) bei 37°C und 600 rpm für 60 min inkubiert. Im Anschluss wurden 200 µl des Transformationsgemischs auf einem LB-Selektivnährboden ausplattiert. Die so behandelten Bakterien wurden über Nacht bei

37°C in einem Inkubator (Typ B6200, Heraeus, Hanau, D) inkubiert. Die Aufreinigung von Plasmid-DNA erfolgte aus kultivierten Einzelklonen transformierter Bakterien. Hierzu wurden Einzelkolonien mittels steriler Impföse von bewachsenen LB-Selektivnährböden abgenommen und damit, je nach Präparationsmaßstab, 5-200 ml mit Selektionsantibiotikum versetzte LB-Nährlösung inokuliert. Nach einer Inkubation über Nacht im Schüttelinkubator (Innova 4330, New Brunswick Scientific, Enfield, CT, USA) bei 200 rpm und 37°C wurden die Bakterienkulturen zentrifugiert (Sorvall RC 5C Plus, Thermo Scientific, 6000 rpm, 10 min, 4°C) und die Plasmid-DNA aus dem Bakteriensediment aufgereinigt.

3.2.1.9. Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Bakterien

Die verwendeten chemisch kompetenten *E. coli*-Bakterien wurden mit CaCl₂ kompetent gemacht. Hierfür wurden Einzelkolonien des entsprechenden *E. coli*-Stamms in 100 ml LB-Nährlösung über Nacht bei 37°C und 200 rpm kultiviert. 0,5 ml der Kultur wurden dann in 50 ml LB-Nährlösung überführt und bis zu einer OD_{600nm} von 0,7-0,8 bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Kultur für 15 min auf Eis gehalten und danach bei 4000 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0 R). Die sedimentierten Bakterien wurden in 25 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und der Ansatz 30 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde bei 4°C und 4000 rpm für 5 min zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0 R) und der Überstand verworfen. Die sedimentierten Bakterien wurden in 2,5 ml eiskalter CaCl₂-Lösung, dem zuvor 10 % Glycerol (V/V) zugesetzt wurden, resuspendiert. Die Bakterien wurden zu 100 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur Verwendung wurden sie bei -80°C gelagert.

3.2.1.10. Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Mithilfe von Restriktionsendonukleasen ist es möglich DNA spezifisch an den palindromischen Erkennungssequenzen der unterschiedlichen Enzyme zu schneiden. In dieser Arbeit wurden die präparativen und analytischen Restriktionsansätze mit Enzymen der Firma Thermo Scientific und den dazu gelieferten Reaktionspuffern durchgeführt. Hierfür wurden 300 ng bis 5 µg DNA mit 3-20 U Enzym bei 37°C je nach DNA-Menge für eine bis mehrere Stunden in dem entsprechenden Reaktionspuffer inkubiert.

3.2.1.11. Klonierung von DNA-Fragmenten in Expressionsvektoren

Durch PCR-Reaktion, Restriktionsverdau oder DNA-Hybridisierung gewonnene DNA-Fragmente wurden in die MCS (*multiple cloning site*, Multiple Klonierungsstelle) von kommerziellen Expressionsvektoren ligiert. Die MCS verfügt über eine Vielzahl an

Erkennungssequenzen verschiedener Restriktionsendonukleasen und liegt im Vektor der jeweiligen Promotorregion nachgelagert. Zu ligierende DNA-Fragmente wurden mit denselben Restriktionsendonukleasen verdaut oder entsprechend synthetisiert, mit denen der Expressionsvektor linearisiert wurde. So wurden DNA-Enden mit komplementären Überhängen generiert, was die Effizienz der Ligationsreaktion stark erhöht. Bei der Wahl der Klonierstrategie wurde das Leseraster des jeweiligen Expressionsvektors berücksichtigt, damit sich DNA-Abschnitte, die C- oder N-terminal von der MCS lagen und für Affinitäts- oder Fluoreszenz-tags kodierten, im gleichen Leserahmen befanden.

3.2.1.12. Direkte Klonierung von PCR-Produkten

Für die direkte Klonierung von PCR-Produkten, also ohne vorhergehenden Restriktionsverdau, wurde das *Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit* nach Angaben des Herstellers verwendet.

3.2.1.13. Klonierung von shRNA-Konstrukten

Die einzelsträngigen Oligonukleotide für die Klonierung von shRNA-Konstrukten wurden zunächst hybridisiert. Hierfür wurden sie in Hybridisierungspuffer (je 5 µM) für 5 min auf 95°C erhitzt, anschließend für 5 min auf 85°C und danach langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Die doppelsträngigen Oligonukleotide wurden dann in den linearisierten pSUPER.retro.gfp+neo shRNA-Expressionsvektor ligiert und der Ligationsansatz in *E. coli*-Bakterien transformiert.

3.2.1.14. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der in dieser Arbeit klonierten und verwendeten Plasmid-DNA wurde bei der Firma GATC (Konstanz, D) in Auftrag gegeben.

3.2.2. Proteinbiochemische Methoden

3.2.2.1. Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

3.2.2.1.1. Expression in *E. coli*

Für die Synthese von GST-Fusionsproteinen (Glutathion-S-Transferase) wurden die Expressionsvektoren pGEX-4T und pGEX-2T verwendet und so die Proteine als Fusionsproteine mit N-terminalem GST-tag produziert. Die Expression erfolgte in den *E. coli*-Stämmen Rosetta oder TG1. Nach der Transformation der Plasmid-DNA wurden 200 ml LB-Nährlösung mit einer Einzelkolonie vom LB-Nährboden inokuliert und als

Vorkultur über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Je 1 l LB-Nährlösung der Hauptkultur wurden mit 25 ml der Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD_{600nm} von 0,6–0,8 bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Die OD_{600nm} wurde mit einem Photospektrometer (Ultrospec 2100 pro, GE Healthcare) in regelmäßigen Abständen bestimmt. Nach dem Erreichen der erforderlichen OD_{600nm} wurde Isopropylthiogalaktosid (finale Konzentration: 250 mM) zur Induktion der Proteinsynthese hinzugegeben und die Kulturen bei 25°C und 200 rpm über Nacht weiter inkubiert.

3.2.2.1.2. Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen aus *E. coli*-Kulturen

Die Aufreinigung der GST-Fusionsproteine erfolgte affinitätschromatographisch über eine Glutathion-gekoppelte Sepharosematrix. Hierbei macht man sich die hohe Affinität der Glutathion-S-Transferase zu Glutathion zunutze. Nach der Ernte der Bakterien durch Zentrifugation der Kulturen (Sorvall RC 5C Plus, Thermo Scientific, 6000 rpm, 10 min, 4°C) wurde das Bakteriensediment zum weiteren Aufschluss der Bakterien in Lysispuffer resuspendiert (10 ml Lysispuffer pro 1 l Bakterienkultur). Der Aufschluss der *E. coli*-Bakterien erfolgte durch Ultraschallbehandlung der Bakteriensuspension (3-mal 30 s bei 70 % Power und 70 % Cycle) mit einem Homogenisator (Sonopuls HD 60, Bandelin, Berlin, D) auf Eis. Anschließend wurde das Zelllysat zentrifugiert (Sorvall RC 6 Plus, Thermo Scientific, 20.000 rpm, 30 min, 4°C), um den Zelldebris abzutrennen. Der Überstand wurde mit vorher in Lysispuffer äquilibrierten Glutathion-Sepharosebeads für 2 h bei 4°C rotierend inkubiert (125 µl Beads pro 1 l Bakterienkultur). Nach der Inkubation wurde das Lysat-Bead-Gemisch über eine leere PD-10 Säule gegeben, wobei die Sepharosebeads durch eine eingelegte Kunststofffritte zurückgehalten wurden. Der Durchfluss wurde verworfen. Die zurückgehaltenen Sepharosebeads wurden nun mit Waschpuffer auf der Säule gewaschen (20-30 ml pro 1 l Bakterienkultur), um Verunreinigungen durch Lipide, Kohlenhydrate und niederaffin gebundene Proteine von der Matrix zu entfernen. Die beschriebenen Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Zur Elution der GST-Fusionsproteine wurde die Säule verschlossen und die Beads mit Elutionspuffer inkubiert (100 µl Elutionspuffer je 1 l Bakterienkultur für 15 min bei Raumtemperatur). Durch das im Elutionspuffer enthaltene Glutathion werden die GST-Fusionsproteine aus ihrer Bindung an die Matrix gelöst und befinden sich anschließend im aufgefangenen Eluat. Dieser Schritt wurde 3 bis 4-mal wiederholt und die einzelnen Fraktionen auf Eis gelagert. Nach der Aufreinigung wurden die Proteine umgepuffert (Abschnitt 3.2.2.6) und die Konzentration bestimmt (Abschnitt 3.2.2.5). Mittels flüssigen Stickstoffs wurden die Proteinlösungen eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.2.2.1.3. Thrombinspaltung von GST-Fusionsproteinen

Eine weitere Möglichkeit die rekombinanten Proteine von der Glutathion-Sepharosematrix zu eluieren ist die Abspaltung des GST-tag an der Thrombinspaltstelle, die im Expressionsvektor kodiert ist. Hierfür wurden die Beads auf der PD-10 Säule mit einer Thrombinlösung (125 µl pro 1 l Bakterienkultur, 50 U Thrombin je 500 µl Thrombinspaltpuffer) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend eluiert. Das in der Proteinlösung befindliche Thrombin wurde im Anschluss mithilfe von Benzamidinbeads aus der Lösung entfernt. Hierfür wurden 50 µl Beads pro 500 µl Eluat für 20 min bei 4°C rotierend inkubiert. Durch Zentrifugation bei 1800 rpm und 4°C für 2 min (Centrifuge 5424 R, Eppendorf) wurden die Beads mit dem gebundenen Thrombin von der Lösung getrennt.

3.2.2.2. Aufreinigung von 6xHistidin-Fusionsproteinen

3.2.2.2.1. Expression in *E. coli*

Die Synthese von 6xHistidin-Fusionsproteinen in *E. coli*-Bakterien wurde in dem Stamm BL21 durchgeführt. Dafür wurden die entsprechenden DNA-Konstrukte des Vektors pET28a in die Bakterien transformiert und mit je 50 ml Übernachtskultur je 1 l LB-Nährlösung für die Hauptkultur inokuliert. Nach dem Erreichen einer OD_{600nm} von 0,7-0,9 wurde die Proteinsynthese durch Zugabe von Isopropylthiogalaktosid (finale Konzentration: 250 mM) induziert. Die Proteinsynthese wurde bei 21°C und 200 rpm über Nacht durchgeführt.

3.2.2.2.2. Expression in *B. megaterium*

Die Synthese beider CDT-Komponenten erfolgte in *B. megaterium*-Bakterien mittels pHis1522-Expressionsvektor. Hierbei werden die Proteintoxine mit einem 6xHistidin-tag am Carboxy-Terminus synthetisiert. Je 1 l LB-Nährlösung der Hauptkultur wurden mit 50 ml einer transformierten *B. megaterium*-Übernachtskultur inokuliert und bei 37°C und 200 rpm bis zu einer OD_{600nm} von 0,6 kultiviert. Nach dem Erreichen der erforderlichen OD wurde die Proteinsynthese durch Zugabe von 5 % (m/V) Xylose zur Kultur induziert. Die Kultur wurde anschließend bei 28°C und 200 rpm über Nacht inkubiert.

3.2.2.2.3. Aufreinigung von 6xHistidin-Fusionsproteinen aus *E. coli*-Kulturen

Die Aufreinigung von 6xHistidin-Fusionsproteinen basiert auf einer Ni²⁺-Affinitätschromatographie. Hierfür werden an eine Matrix gekoppelte Ni²⁺-Ionen verwendet (Ni²⁺-IDA-Protino-Resin), die eine hohe Affinität zu dem 6xHistidin-tag der rekombinanten Proteine haben. Für die abschließende Elution von der Ni²⁺-Matrix werden hohe Konzentrationen von Imidazol (500 mM) verwendet, um die gebundenen Proteine aus

ihrer Ni^{2+} -Bindung zu verdrängen. Im Anschluss an die Bakterienernte durch Zentrifugation (Sorvall RC 5C Plus, 6000 rpm, 10 min, 4°C) wurden die *E. coli*-Bakterien in Lysispuffer resuspendiert (3 ml Lysispuffer pro 1 mg Bakteriensediment). Der Aufschluss der Bakterien erfolgte zunächst durch Ultraschallbehandlung (3-mal 30 s bei 70 % Power und 70 % Cycle). Das Bakterienlysat wurde zentrifugiert (Sorvall RC 6 Plus, 20.000 rpm, 30 min, 4°C) und so der Zelldebris abgetrennt. Das klare Zelllysat wurde für 90 min mit Ni^{2+} -Beads bei 4°C rotierend inkubiert. Pro 1 l Bakterienkultur wurden 150 mg Ni^{2+} -Beads verwendet. Das Lysat- Ni^{2+} -Bead-Gemisch wurde nach der Inkubationszeit auf eine leere PD-10 Säule gegeben, wobei die Protein-beladenen Ni^{2+} -Beads durch eine eingelegte Kunststofffritte zurückgehalten wurden. Der Durchfluss wurde verworfen. Nach dem Waschen der beladenen Ni^{2+} -Beads mit 15 bis 20 Säulenvolumen Waschpuffer wurde die Säule verschlossen und die Ni^{2+} -Beads mit Elutionspuffer (1 ml Elutionspuffer pro 1 l Bakterienkultur) für 10 min bei 4°C inkubiert. Durch Öffnen der Säule wurde das Eluat aufgefangen und auf Eis gelagert. Durch Wiederholung dieses Vorgangs wurden 3-4 Eluate gewonnen. Nach der Aufreinigung wurden die Proteine umpufferf (Abschnitt 3.2.2.6) und die Konzentration bestimmt (Abschnitt 3.2.2.5). Mittels flüssigen Stickstoffs wurden die Proteinlösungen eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.2.2.2.4. Aufreinigung von 6xHistidin-Fusionsproteinen aus *B. megaterium*-Kulturen

Die Aufreinigung von 6xHistidin-Fusionsproteinen aus *B. megaterium*-Bakterien wurde genauso wie die beschriebene Aufreinigung aus *E. coli*-Bakterien durchgeführt (Abschnitt 3.2.2.2.3). Bei der Aufreinigung aus *B. megaterium* wurde ein weiterer Aufschluss der Bacilli durch zwei- bis dreimalige Passage der Bakterienlysate durch einen Mikrofluidizer (M-110P, Microfluidics, MA, USA) bei 18.000 bis 20.000 psi erreicht.

3.2.2.3. Trypsinaktivierung von C2II und CDTb

Nach der Aufreinigung und Umpufferung von C2II und CDTb benötigen diese zur Aktivierung die Abspaltung eines circa 20 kDa schweren Fragments durch Trypsin vom Amino-Terminus. Hierfür wurden pro 1 mg Protein 100 µg Trypsin eingesetzt und das Reaktionsgemisch für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 30 min wurde die Spaltung des Proteins durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung überprüft. Nach vollständiger Spaltung des Proteins wurde die Reaktion durch Zugabe eines Trypsininhibitors (150 µg pro 1 mg Protein, 20 min auf Eis) abgestoppt. Anschließend wurde die Proteinlösung aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.2.2.4. Herstellung GST-Fusionsprotein-beladenener Sepharosebeads

Für Pulldown-Experimente wurden mit GST oder GST-Fusionsproteinen beladene Glutathion-Sepharosebeads verwendet. Für die Herstellung wurden die Expression, der Ansatz der Hauptkultur und die Induktion der Proteinsynthese analog zu Abschnitt 3.2.2.1.1 durchgeführt. Die Proteinsynthese wurde allerdings für 4 h bei 37°C durchgeführt. Im Anschluss wurden die Bakterien mit den gleichen Puffern und Methoden wie in den Abschnitten 3.1.7.1.3 und 3.2.2.1.2 beschrieben aufgeschlossen und die Lysate mit 100 µl gewaschenen Glutathion-Sepharosebeads pro 1 l Hauptkultur für 90 min bei 4°C rotierend inkubiert. Im Anschluss wurde das Lysat-Bead-Gemisch über eine PD-10 Säule gegeben und so die Beads separiert. Die Beads wurden mit einem Säulenvolumen Lysispuffer und im Anschluss mit 3-4 Säulenvolumen GST-fish Puffer gewaschen. Die beladenen Beads wurden in GST-fish Puffer resuspendiert (100 µl GST-fish Puffer/100 µl Beads) und à 20 µl aliquotiert. Mittels flüssigen Stickstoffs wurden sie eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.2.5. Bestimmung der Konzentration von Proteinlösungen

Die Konzentration von Proteinlösungen lässt sich photometrisch mittels der Bradfordreaktion bestimmen. Hier wird sich die Eigenschaft von Coomassie-Brilliant Blue G250 zunutze gemacht, sein Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm Lichtwellenlänge zu verschieben, wenn es an Proteine bindet. So ist der Anstieg der Absorption bei 595 nm proportional zum gebundenen Coomassiereagenz. Die Proteinkonzentration kann über eine vorher erstellte Eichgerade ermittelt werden. Hier wurden 5 µl Proteinlösung mit 795 µl H₂O und 200 µl Bradfordreagenz vermischt und die Absorption bei 595 nm Lichtwellenlänge gegen einen Standard gemessen. Außerdem wurden Konzentrationen von Proteinen in Lösungen durch den Vergleich mit mitgeführten definierten Mengen von BSA bei der SDS-PAGE und anschließender Sichtbarmachung der Proteine durch Coomassie-Färbung bestimmt.

3.2.2.6. Umpuffern von Proteinlösungen

Das Umpuffern von Proteinlösungen erfolgte durch PD-10 Säulen, die mit einer Sephadex G-25 Matrix beschickt waren. Moleküle bis zu 5 kDa können mit der feinporigen Matrix interagieren, während größere Moleküle die Matrix ungehindert passieren. So können Proteine von niedermolekularen Substanzen getrennt werden. Hierzu wurden die Säulen mit 25 ml Dialysepuffer äquilibriert und 2,5 ml Proteinlösung auf die Säule gegeben. Im Anschluss wurden die Proteine mit 3,5 ml Dialysepuffer von der Säule eluiert. Die Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt.

3.2.2.7. Markierung von CDTa und CDTb mit Maleimid Alexa 568

Die Fluoreszenzmarkierung von CDTa und CDTb erfolgte mittels eines Alexa 568 Maleimid-Konjugats. Maleimid ist eine Substanz, die reaktiv gegenüber Thiolgruppen ist, so lässt sich das Fluorophor an die Cysteinseitenketten von Proteinen kovalent binden. Hierfür wurde das Fluorophorkonjugat (10 mM in Dimethylsulfoxid) zur Proteinlösung in einem molaren Verhältnis von 10-20 mol Fluorophorkonjugat pro 1 mol Protein dazugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei 21°C für 2 h rotierend und vor Licht geschützt inkubiert. Die Proteinlösung wurde im Anschluss mittels Gelfiltration umgepuffert, um ungebundenen Farbstoff zu entfernen.

3.2.2.8. ADP-Nachribosylierung und in vitro-ADP-Ribosylierung

3.2.2.8.1. ADP-Nachribosylierung

Mittels ADP-Nachribosylierung lässt sich die Aktin-ADP-Ribosylierung durch eine Zellvergiftung mit CDT quantitativ untersuchen. Es lassen sich Effekte verschiedener Substanzen oder Bedingungen auf die Toxinaufnahme oder Toxinaktivität bestimmen. Hierfür wurden Zellen unterschiedlich lang mit CDT behandelt und Zelllysate hergestellt. Die Zelllysate wurden zusammen mit der enzymatischen Komponente des C2-Toxins von *Clostridium botulinum*, welches Aktin ebenfalls wie CDTa an der Position Arg-177 ADP-ribosyliert, und dem radioaktiv markierten Cosubstrat [³²P]NAD inkubiert. So lässt sich durch anschließende SDS-PAGE und Autoradiographie das durch C2I modifizierte Aktin nachweisen. Hierfür wurden die verwendeten Caco-2-Zellen in 6-well-Platten bis zur Konfluenz kultiviert und entsprechend des Experiments behandelt. Nach der Behandlung mit CDT wurden die Zellen auf Eis überführt und mit eiskaltem PBS gewaschen. Nach dem Abschaben zusammen mit 150 µl ADP-Ribosylierungspuffer wurden die Zellen mittels mehrmaliger Passage durch eine 26 Gauge Kanüle aufgeschlossen und mit 14.000 rpm bei 4°C für 20 min zentrifugiert (Centrifuge 5418 R, Eppendorf). Der Überstand wurde für die Experimente weiter verwendet und in flüssigem Stickstoff zwischengelagert. Vorher wurden 5 µl für eine Konzentrationsbestimmung mittels Bradfordreaktion entnommen, um die Menge an eingesetztem Lysatprotein anzugleichen. Die Reaktionsansätze (40 µl) wurden auf Eis pipettiert und wie folgt zusammengemischt: Es wurden 30 µg Lysatprotein mit 200 ng C2I und 4 µl (500 nCi) [³²P]NAD in ADP-Ribosylierungspuffer für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 10 µl 5xLämmli-Probenpuffer versetzt und für 5 min auf 95°C erhitzt. Die Proben wurden im Anschluss per SDS-PAGE aufgetrennt und das getrocknete Acrylamidgel per Phosphorimager SI (GE Healthcare, Freiburg) ausgelesen.

3.2.2.8.2. In vitro-ADP-Ribosylierung

Bei der in vitro-ADP-Ribosylierung wird eine ADP-Ribosyltransferase zusammen mit ihrem Substrat, in diesem Fall CDTa mit Aktin, in Gegenwart des radioaktiv markierten Cosubstrats [^{32}P]NAD inkubiert. So lassen sich unter anderem die Aktivitäten verschiedener CDTa-Präparationen vergleichen oder der Effekt verschiedener Substanzen auf die enzymatische Aktivität des Toxins untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wurden jeweils ansteigende Konzentrationen von Methyl- β -Cyclodextrin (1-10 mM) zusammen mit 2 μg aufgereinigtem Aktin, [^{32}P]NAD (500 nCi) und 500 ng CDTa in 40 μl ADP-Ribosylierungspuffer für 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsansätze mit 10 μl 5xLämmli-Probenpuffer versetzt und 5 min auf 95°C erhitzt. Anschließend wurde eine SDS-PAGE der Proben durchgeführt und das getrocknete Acrylamidgel per Phosphorimager ausgelesen.

3.2.2.9. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Methode der SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) erlaubt die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht in einem Polyacrylamidgel, wobei Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine sowie deren Eigenladung keine Rolle spielen. Hierfür erhalten die Proteine einer Probe durch das anionische Detergens Natriumdodecylsulfat eine negative Gesamtladung. Im Probenpuffer enthaltenes Dithiothreitol reduziert vorhandene Disulfidbrücken des Proteins. Zusammen mit dem Aufkochen der Probe führt dies zu einer Linearisierung und einer negativen Gesamtladung der Proteine. Das Migrationsverhalten im Acrylamidgel richtet sich dann ausschließlich nach dem Molekulargewicht der Proteine. Natriumdodecylsulfat komplexiert Proteine in einem konstanten Verhältnis von 1,4 g Natriumdodecylsulfat zu 1 g Protein, sodass verschiedene Proteine zuverlässig nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und miteinander verglichen werden können.

3.2.2.9.1. Probenvorbereitung

Die hier verwendeten Proteinproben und Zelllysate wurden im Verhältnis von 1:5 mit 5xLämmli-Probenpuffer versetzt und 5 min lang auf 95°C erhitzt.

3.2.2.9.2. Gelelektrophorese

Die hier verwendeten Acrylamidgele (Kammstärke 1 mm) wurden in die Gelelektrophoresekommer (Mini-Protean Tetra Apparaturen, Biorad) eingespannt und diese mit SDS-Laufpuffer befüllt. Die wie in Abschnitt 3.2.2.9.1 beschriebenen vorbereiteten Proben

wurden zusammen mit einem mitgeführten Proteinstandard in die Taschen des Gels gefüllt. Die Durchführung der Elektrophorese erfolgte bei konstanter Stromstärke von 25 mA pro Gel. Die Dauer der Elektrophorese richtete sich nach den jeweiligen Proben.

3.2.2.10. Coomassie-Färbung von Acrylamidgelen

Zur Sichtbarmachung der Proteinbanden in Acrylamidgelen wurden diese mit Coomassie-Färbelösung angefärbt. Hierfür wurden die Gele mit der Färbelösung bedeckt, auf circa 50°C erhitzt und für 10-15 min inkubiert. Anschließend wurde die überschüssige Färbelösung abgegossen und durch mehrmaliges Waschen des Gels in Entfärbelösung der ungebundene Farbstoff aus dem Gel gewaschen. Die so behandelten Acrylamidgele wurden anschließend durch einen Vakuum-Geltrockner (Roth) getrocknet.

3.2.2.11. Western-Blot

Proteine können aus Acrylamidgelen durch das sogenannte Western-Blot-Verfahren auf eine Membran transferiert werden, auf der sie für weitere Untersuchungen zur Verfügung stehen. Hier wurden nach der SDS-PAGE die aufgetrennten Proteine mittels Elektrotransfer im *semidry*-Verfahren auf eine Polyvinylidenfluorid-Transfermembran übertragen. Dies geschah mithilfe einer Blotapparatur (SemiDry Transfer Cell Trans Blot SD, Biorad), durch die mittels einer angeschlossenen Stromquelle (PowerPac HV Power Supply, Biorad) konstanter Strom (100 mA pro Gel) geleitet wurde. Die Proteine aus dem Acrylamidgel wandern im elektrischen Feld in Richtung der Anode und werden auf der untergelegten Transfermembran abgestoppt. Das Acrylamidgel und die untergelegte Transfermembran wurden zwischen mehreren Lagen mit Blotpuffer getränkten Blottingpapieren in der Blotapparatur eingespannt.

3.2.2.12. Immunodetektion

Durch die Immunodetektion können die auf einer Transfermembran im Western-Blot-Verfahren fixierten Proteine identifiziert und sichtbar gemacht werden. Hierfür wird die Blotmembran zunächst mit Antikörpern (primäre Antikörper), die spezifisch an das zu untersuchende Protein binden, inkubiert. Im Anschluss wird die Blotmembran mit einer zweiten Antikörperlösung (sekundärer Antikörper) inkubiert, deren Antikörper an den Fc-Teil der primären Antikörper binden. Die sekundären Antikörper sind an Reporterenzyme gekoppelt, die mit den Lösungen ECL-1 und -2 (*enhanced chemoluminescence system*) reagieren und Lichtsignale erzeugen. Für die hier durchgeführten Untersuchungen wurden die Blotmembranen nach dem Transfer für 30 min mit Blockierlösung bei Raumtemperatur inkubiert. Das in der Blockierlösung enthaltene Milchprotein sättigt die unspezifischen

Bindungsstellen auf den Transfermembranen ab, sodass die Spezifität der Bindung der anschließend inkubierten Antikörper erhöht wird. Für die Inkubation mit den primären Antikörpern wurden diese in Blockierlösung in entsprechender Verdünnung gelöst und für 1 h bei Raumtemperatur mit den Blotmembranen inkubiert. Anschließend wurden die Blotmembranen 3-mal für 5 min mit TBS-Tween gewaschen, um unspezifische Antikörperbindungen zu lösen. Die Sekundärantikörper, die hier mit einer Meerrettichperoxidase gekoppelt waren, wurden für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Blotmembranen 3-mal für 5 min mit TBS-Tween gewaschen. Für die Auswertung der Blotmembranen wurden die Lösungen ECL-1 und -2 im Verhältnis 1:1 gemischt und für 1 min mit der Blotmembran inkubiert. Anschließend wurde die entstehende Chemolumineszenz mit dem LAS-3000 mini Imaging System (Fuji, Düsseldorf, D) detektiert.

3.2.2.13. Ponceau-Färbung

Auf einer Blotmembran können die transferierten Proteine durch die Ponceau-Färbung sichtbar gemacht werden. Hierfür wurden die Blotmembranen für 5 min bei Raumtemperatur mit der Ponceau-Färbelösung inkubiert. Nach Entfernen von überschüssiger Färbelösung und mehrmaligem Waschen der Blotmembran mit H₂O wurden die Proteine sichtbar.

3.2.2.14. Pulldown-Experimente

Pulldown-Experimente dienen dem Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen. Für die Durchführung wird ein Protein an einer Matrix immobilisiert. Hier wurden Glutathion-Sepharosebeads verwendet, an die rekombinante GST oder GST-Fusionsproteine gekoppelt wurden. Durch Inkubation der immobilisierten Proteine mit Zelllysaten oder Lösungen rekombinanter Proteine lassen sich Proteine nachweisen, die mit den Matrix-gebundenen Proteinen interagieren. Hierfür wurden die beladenen Beads, die mit unbeladenen Sepharosebeads auf ein Volumen von je 20 µl aufgefüllt worden waren, zusammen mit den Zelllysaten oder den rekombinanten Proteinen bei 4°C rotierend für 90 min inkubiert. Dabei wurden in etwa gleiche Mengen gebundene GST oder GST-Fusionsproteine verwendet. Die verwendeten Zelllysate wurden mit GST-fish Puffer hergestellt, die rekombinanten Proteine in GST-fish Puffer gelöst. Nach der Inkubationszeit wurden mehrere Waschschrte durchgeführt (4-mal mit GST-fish Puffer bei Experimenten mit Zelllysaten, sowie 1-mal mit Hochsalzpuffer und 3-mal mit GST-fish Puffer bei Experimenten mit Lösungen rekombinanter Proteine). Zwischen den Waschschrten wurde das Reaktionsgemisch stets bei 1800 rpm und 4°C für 2 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zum Nachweis der Proteinbindung wurden anschließend eine SDS-PAGE, ein

Western-Blot und eine Immunodetektion mit je gleichen Mengen des Reaktions- und Kontrollansatzes durchgeführt.

3.2.2.15. Mikrotubuli-Spindown-Experimente

Zur Untersuchung der Bindung von Proteinen an polymerisierte Mikrotubuli kann man sogenannte Mikrotubuli-Spindown-Experimente durchführen. Hierbei wird aufgereinigtes natives Tubulin zu 5-10 µm langen Filamenten polymerisiert, die durch Taxol stabilisiert werden. Diese werden mit den zu untersuchenden Proteinen inkubiert und im Anschluss bei 100.000 g zentrifugiert. Durch die starke Gravitationskraft sedimentieren die Mikrotubuli mit an ihnen haftenden Proteinen. Für die Durchführung dieser Experimente wurden kommerziell erhältliche Komponenten der Firma Cytoskeleton verwendet (Abschnitt 3.1.7.1.9 und Tabelle 60). Das im Lieferumfang enthaltene Tubulin wurde in Anwesenheit von GTP polymerisiert. Hierfür wurden 20 µl einer 5 mg/ml Tubulinlösung in *General-Tubulin-Buffer* mit 1 mM GTP und 2 µl *Cushion-Buffer* versetzt und für 20 min bei 35°C inkubiert. Im Anschluss wurde der Reaktionsansatz in 200 µl und 35°C warmen *General-Tubulin-Buffer*, der 20 µM Taxol enthielt, resuspendiert. Die so präparierte Lösung enthielt nach Herstellerangaben Mikrotubuli von 5-10 µm Länge in einer Konzentration von circa 0,4 nM. Für die Experimente wurden 20 µl der Mikrotubulilösung zusammen mit je 0,67 µg Septin 2, 6, oder 7 und *General-Tubulin-Buffer*, der mit 20 µM versetzt Taxol worden war, zu einem 50 µl Reaktionsansatz vermischt und bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Die Kontrollansätze, die keine Mikrotubuli enthielten, wurden genauso behandelt. Im Anschluss wurden je 100 µl mit 20 µM Taxol versetzter *Cushion-Buffer*, welcher in einem Ultrazentrifugenröhrchen platziert worden war, mit jeweils einem Reaktionsansatz überschichtet. Nach 40-minütiger Zentrifugation bei 100.000 g (Optima LE-80 Ultracentrifuge, Beckmann Coulter, Krefeld, D) wurden die obersten 50 µl aus dem Röhrchen entnommen und mit 10 µl 5xLämmli-puffer versetzt. Die restliche Flüssigkeit wurde aus dem Röhrchen entnommen und verworfen. Das Sediment wurde in 50 µl 95°C heißem Lämmli-puffer resuspendiert. Die Kontrollansätze, bei denen keine Mikrotubuli mitgeführt wurden, wurden genauso behandelt. Je 20 µl des Überstands und des Sediments wurden durch SDS-PAGE und Immunoblot-Verfahren analysiert.

3.2.2.16. Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie

Mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie lassen sich die Interaktionen zwischen verschiedenen Molekülen untersuchen und Assoziations- und Dissoziationskinetiken bestimmen. Mittels eines Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskops werden kleinste Änderungen im Brechungsindex eines reflektierten planar polarisierten Lichtstrahls gemessen.

Dieser wird von der Oberfläche eines Sensorchips reflektiert, auf dessen anderer Seite er ein evaneszierendes Feld erzeugt. Auf der Seite des evaneszierenden Felds werden Liganden auf dem Sensorchip immobilisiert und Analyten hinüber geleitet. Bei einer Ligand-Analyten-Interaktion verstärkt sich das evaneszierende Feld und der Lichtstrahl verändert seinen Brechungsindex. So gibt die Veränderung des Brechungswinkels die Menge des gebundenen Analyten wieder, und eine zeitliche Ableitung erlaubt die Bestimmung der Affinitäten. Hier wurde ein Biachore X 100 (GE Healthcare) Oberflächenplasmonenresonanzspektroskop verwendet und die Interaktion zwischen verschiedenen 6xHistidin-*getaggt*en Septinen und GST-*getaggt*em EB1 gemessen. Hierfür wurde ein Sensorchip verwendet, der mit einer NTA-Matrix beschichtet war (GE Healthcare). Auf dem NTA-Chip wurden vor jedem Messdurchlauf Ni^{2+} -Ionen komplexiert. Hierfür wurde eine Nickel(II)-sulfat-Lösung für 120 s mit einer Flussrate von 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ über den im Spektroskop eingesetzten Sensorchip geleitet. Nach einem Waschschrift mit einer EDTA-Lösung (3 mM in Laufpuffer) wurde eine Stabilisationsphase von 120 s einprogrammiert. Im Folgenden wurden 6xHistidin-*getaggt*e Septinproteine immobilisiert. Hierfür wurde eine Septinlösung (200 nM in Laufpuffer) für 120 s mit einer Flussrate von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ über den Sensorchip geleitet. In der folgenden 120 s andauernden Stabilisationszeit wurde eine stabile Septinassoziation an den Ni^{2+} -beladenen Sensorchip erreicht. Anschließend wurden Proteinlösungen in aufsteigender Konzentration (EB1-GST oder GST 3,7-11,11-33,33-100-300 nM in Laufpuffer) über den Septin-beladenen Sensorchip geleitet. Dies geschah für die unterschiedlich konzentrierten Lösungen je über 60 s mit einer Flussrate von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$, gefolgt von einer Dissoziationszeit von 120 s. Die dabei entstehende Plasmonresonanz wurde währenddessen aufgezeichnet. Im Anschluss wurde der Sensorchip mit Guanidiniumchloridlösung (6 M in H_2O , 2-mal für je 120 s) und mit einem anschließenden Waschschrift mit Laufpuffer für 120 s bei einer Flussrate von je 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ regeneriert. Die Messungen wurden bei 21°C durchgeführt. Für jeden Lauf wurde zunächst die Messung mit EB1-GST und im Anschluss mit GST zur Kontrolle durchgeführt. Nach den Messläufen wurden die kinetischen Konstanten der Assoziation (k_a) und der Dissoziation (k_d) mit der Biacore-Evaluationssoftware bestimmt und deren Quotient (KD) als Maß für die Bindungsaffinität verwendet.

3.2.3. Zellbiologische Methoden

3.2.3.1. Kultivieren und Passagieren verwendeter humaner Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien wurden in einem Inkubator (Heracell 150, Heraeus) bei 37°C und einer mit 5 % CO₂ angereicherten feuchten Atmosphäre in den angegebenen Kulturmedien inkubiert. Für das Passagieren der adhärent wachsenden Zellen wurde in regelmäßigen Abständen das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit sterilem und 37°C warmen PBS gewaschen. So wurden die Zellen von restlichem Kulturmedium befreit. Im Anschluss wurden sie mit Trypsin/EDTA (1x in PBS) im Brutschrank inkubiert, bis sich die Zellen vom Boden des Kulturgefäßes gelöst hatten. Anschließend wurden sie in 37°C warmen Kulturmedium resuspendiert und bei Raumtemperatur für 3 min und 800 rpm (Megafuge 1.0, Heraeus) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die sedimentierten Zellen in warmem Kulturmedium resuspendiert. Anschließend wurden sie in mit frischem und warmem Kulturmedium beschickte Kulturgefäße ausgesät. Für Experimente wurden die Zellen in verschiedene Kulturgefäße in unterschiedlicher Menge ausgesät. Hierfür wurden die Zellen vor dem Aussäen mit einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

3.2.3.2. Transfektion humaner Zelllinien

Als Transfektion bezeichnet man das Einbringen von fremder Erbinformation in eukaryote Zellen. In der vorliegenden Arbeit wurden Caco-2-Zellen und HeLa-Zellen mit Konstrukten eukaryoter Expressionsvektoren transfiziert. Für die Transfektion der Caco-2-Zellen wurde das Transfektionsreagenz Lipofectamine 2000 nach den Angaben des Herstellers verwendet. Für die Herstellung des Transfektionsansatzes wurde das serumreduzierte Medium Opti-MEM verwendet. Die Transfektion von HeLa-Zellkulturen erfolgte mithilfe von PEI-Lösung. Hierfür wurden die Zellen 2 h mit zusatzfreiem Dulbecco's Modified Eagle Medium inkubiert und anschließend der Transfektionsansatz hinzugegeben. Die Transfektionsreaktion wurde für 4 h im Inkubator durchgeführt und anschließend die Zellen mit 37°C warmen Kulturmedium gewaschen und weiter inkubiert. Für einen Transfektionsansatz wurden pro 1 ml zusatzfreiem Dulbecco's Modified Eagle Medium 100 µl Opti-MEM mit 7,5 µl PEI-Lösung versetzt und gut vermischt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 3 µg DNA hinzugegeben. Der Transfektionsansatz wurde gut vermischt und für 12 min bei Raumtemperatur inkubiert.

3.2.3.3. Herstellung von Zelllysaten

Die Zellen wurden aus dem Inkubator entnommen und auf Eis überführt. Nachdem das Kulturmedium entfernt wurde, wurden sie einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit entsprechendem eiskaltem Puffer versetzt. Bei weiterer Inkubation auf Eis wurden sie mithilfe eines Zellschabers vom Kulturgefäß gelöst, resuspendiert und in ein Reagiergefäß überführt. Hier wurden sie durch mehrmaliges druckvolles Passagieren durch eine 26 Gauge Kanüle mithilfe einer Spritze aufgeschlossen und anschließend bei 14.000 rpm bei 4°C für 20 min zentrifugiert (Centrifuge 5418 R, Eppendorf). Der Überstand wurde für Experimente weiter verwendet. Für die Zelllysate, die für ADP-Ribosylierungsexperimente bestimmt waren, wurden pro *well* einer 6-*well*-Platte 150 µl ADP-Ribosylierungspuffer verwendet. Für die Zelllysate, die für Pulldown-Experimente bestimmt waren, wurden pro 10 cm Schale 600 µl GST-fish Puffer verwendet. Für Zelllysate, die nach dem *fluorescence activated cell sorting* aus HeLa-Zellen hergestellt wurden, sind 100 µl Zelllysispuffer auf 400.000 HeLa-Zellen gegeben worden.

3.2.3.4. Fluoreszenzzytologische Methoden

3.2.3.4.1. Fixieren und Permeabilisieren von Zellen

Nach Absaugen des Kulturmediums wurden die Zellen einmal mit 37°C warmen PBS gewaschen und für 15 min mit Fixierlösung bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und bei Raumtemperatur für 10 min mit Permeabilisationslösung inkubiert. Der Permeabilisationsschritt wurde durchgeführt, wenn die Zellen im Anschluss immunzytochemisch behandelt wurden, um den verwendeten Antikörpern das Binden an intrazelluläre Proteine zu ermöglichen. Anschließend wurden die Zellen in PBS überführt.

3.2.3.4.2. Immunzytochemische Färbung von Zellen

Für die fluoreszenzmikroskopische Messung von zellulären Proteinen können zelluläre Proteine direkt mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern sichtbar gemacht werden oder, wie hier durchgeführt, mittels indirekter Immunfluoreszenz. Hierfür wurden die verschiedenen Zelllinien auf HCl-gewaschenen Deckgläschen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 60-70 % inkubiert. Anschließend wurden sie wie in Abschnitt 3.2.3.4.1 beschrieben fixiert und permeabilisiert. Die Zellen wurden für 30 min bei Raumtemperatur mit Blockierlösung überschichtet, um unspezifische Antikörperbindungen zu reduzieren. Anschließend wurden die Zellen bei 4°C über Nacht mit der Primärantikörperlösung (Antikörper entsprechend

verdünnt in Blockierlösung) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend 3-mal für 5 min mit PBS-Tween gewaschen und mit der Sekundärantikörperlösung (Antikörper entsprechend verdünnt in Blockierlösung) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubation mit Antikörpern erfolgte stets in Dunkelheit und feuchter Atmosphäre. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Tween für jeweils 5 min wurden die Zellen über eine Verdünnungsreihe in Ethanol überführt. Nach anschließender Lufttrocknung wurden die Präparate mit 55°C warmem Eindeckmedium auf Objektträgern eingedeckt.

3.2.3.4.3. Fluoreszenzzytochemische Färbung von Zellen

Die Inkubation von Caco-2-Zellen mit den Fluorophor-Konjugaten Phalloidin-Tetramethylrhodamin (250 ng/ml) und Cholera-Toxin-B-Untereinheit-Fluoresceinisothiocyanat (10 µg/ml) wurde gemeinsam mit der Inkubation des Sekundärantikörpers durchgeführt unter ansonstiger Beibehaltung des oben beschriebenen Fixier- und Färbeprotokolls (Abschnitte 3.2.3.4.1 und 3.2.3.4.2.). Die Fluoreszenzmarkierung des Membrancholesterols wurde durch das Polyen-Antibiotikum Filipin erreicht. Hierfür wurden die Caco-2-Zellen wie in Abschnitt 3.2.3.4.1 beschrieben fixiert und anschließend mit einer Filipinlösung (50 µg/ml Filipin in PBS) für 2 h bei Raumtemperatur überschichtet. Anschließend wurden die Caco-2-Zellen 3-mal für 5 min mit PBS gewaschen und eingedeckt.

3.2.3.5. Fluoreszenzmikroskopie

3.2.3.5.1. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Die konfokale Fluoreszenzmikroskopie wurde durchgeführt mit einem Axiovert 200M inversen Auflichtmikroskop (Carl Zeiss, Jena, D), betrieben mit der Metamorph-Mikroskopsoftware (Version 7.7.11.0, Universal Imaging, Downingtown, PA, USA). Das Mikroskop war ausgestattet mit Plan-Apochromat-Objektiven (Carl Zeiss) und einem Emissionsfilterrad (Carl Zeiss). Die Proben wurden mit zwei verschiedenen Diodenlasern (488 nm und 561 nm Lichtwellenlänge) durch eine *spinning-disc* Konfokaleinheit (CSU-X1, Yokogawa, Tokyo, Japan) angeregt, die Emission wurde mit einer Coolsnap HQII Digitalkamera (Roper Scientific, Tucson, AZ, USA) aufgenommen. Alle Fluoreszenzinformationen wurden weiter prozessiert und vermessen mit der MetaMorph-Mikroskopsoftware.

3.2.3.5.2. Epifluoreszenzmikroskopie

Epifluoreszenzaufnahmen wurden mit einem inversen Auflichtmikroskop aufgenommen (Axiovert 200M, Carl Zeiss). Angeschlossen waren eine Quecksilber-Kurzbogen-Reflektorlampe LQ-ME-200 (Leistungselektronik Jena, Jena, D) und ein Filterrads (Carl Zeiss) mit entsprechenden Exzitations- und Emissionsfiltern (Carl Zeiss). Die Emission wurde mit einer Coolsnap HQII Digitalkamera (Roper Scientific) aufgenommen. Alle Fluoreszenzinformationen wurden weiter prozessiert und vermessen mit der MetaMorph-Mikroskopsoftware.

3.2.3.6. Lebendzellmikroskopie

Für die Lebendzellmikroskopie wurden die Zellen in Glasbodenschalen kultiviert und während der Untersuchung auf dem Mikroskop in angefeuchteter Atmosphäre in einer beheizbaren Kammer inkubiert, die konstant mit einem Gasgemisch mit 6,5 % CO₂ und 9 % O₂ Gehalt befüllt wurde. Die Kammer war auf dem unter 3.2.3.5.1 beschriebenen Mikroskop auf einem motorisierten und Software-gesteuerten Mikroskoptisch (Carl Zeiss) montiert, sodass während videomikroskopischer Untersuchungen mehrere Positionen zeit- und punktgenau hintereinander angefahren werden konnten. Die durchlichtmikroskopischen differentiellen Interferenzkontrastaufnahmen und die konfokalen fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen an lebenden Zellen wurden mit dem gleichen technischen Gerät wie unter 3.2.3.5.1 beschrieben durchgeführt.

3.2.3.7. Quantifizierung der Ausläuferbildung

Zur Quantifizierung der Ausläuferbildung wurde das Regionen-Messwerkzeug der MetaMorph-Mikroskopsoftware genutzt. Nach der Kalibrierung der Bildinformationen (1 Pixel/0,1654 µm) wurde die Länge der Ausläufer zu dem Zeitpunkt addiert und auf den entsprechenden Zellumfang bezogen (µm Ausläufer/µm Zellumfang). Die Daten wurden ebenfalls als Ausläuferanzahl/100 µm Zellumfang und durchschnittliche Ausläuferlänge dargestellt.

3.2.3.8. Mikroinjektion

Die Mikroinjektion von CDTa in Caco-2-Zellen wurde mit einem FemtoJet-Mikroinjektor in Verbindung mit einem Injectman NI2-Mikromanipulator, der mit Femtotips-II-Mikroinjektionskapillaren bestückt wurde, durchgeführt (Eppendorf). Die Zellen wurden in Glasbodenschalen kultiviert und für die Manipulation in die unter 3.2.3.6 beschriebene Mikroskopiekammer eingesetzt, wo eine CDTa-Lösung (0.5 ng/µl in PBS) in

verschiedene Zellen injiziert wurde (Injektionszeit 0,4 s, Kapillardruck 100 hPa, Injektionsdruck 140 hPa). Direkt im Anschluss an die Manipulation wurden die injizierten Zellen über den angegebenen Zeitraum aufgenommen.

3.2.3.9. Manipulation der Plasmamembranzusammensetzung von Caco-2-Zellen

3.2.3.9.1. Cholesteroldepletion durch Methyl- β -Cyclodextrin

Die Reduktion des Cholesterolgehalts der Plasmamembran wurde durch die Verwendung des zyklischen Oligosaccharids Methyl- β -Cyclodextrin erreicht. Dieses kann Cholesterol in wässrigen Lösungen aus der Plasmamembran extrahieren, indem es Cholesterol in seiner zyklischen Struktur komplexiert. Für die Cholesterolextraktion wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Methyl- β -Cyclodextrin (1-10 mM) in Cholesteroldepletionspuffer für 30 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit warmem Puffer gewaschen und fixiert oder in warmes Dulbecco's Modified Eagle Medium überführt und lebendzellmikroskopisch untersucht. Zellen in Kontrollexperimenten wurden mit Cholesteroldepletionspuffer ohne Methyl- β -Cyclodextrin behandelt.

3.2.3.9.2. Cholesterolrepletion

Die Repletion von Cholesterol, das heißt das Wiedereinbringen von Cholesterol in die Plasmamembran nach vorangegangener Cholesterolextraktion, wurde mit einer 0,2 mM Lösung von Cholesterol-Methyl- β -Cyclodextrin-Komplexen in Cholesteroldepletionspuffer durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen bei 37°C für die jeweils angegebenen Zeiträume mit dem Reaktionsgemisch inkubiert.

3.2.3.9.3. Behandlung der Zellen mit Nystatin

Nystatin gehört zu der Gruppe der Polyen-Antibiotika. Nystatin bindet an Cholesterol in der Plasmamembran, dadurch hemmt es die Interaktion von Cholesterol mit anderen Plasmamembrankomponenten und stört so die Ordnung innerhalb der Membran. Hier wurden die Zellen mit Nystatin (25 μ g/ml) für die jeweils angegebenen Zeiträume in Zellkulturmedium bei 37°C behandelt.

3.2.3.9.4. Behandlung der Zellen mit Sphingomyelinase

Von der Sphingomyelinase, die eine Spaltung von Sphingomyelin in Ceramid und Phosphorylcholin katalysiert, wurden 0,5 U pro 1 ml Zellkulturmedium verwendet und die Zellen bei 37°C für die angegebenen Zeiträume inkubiert.

3.2.3.9.5. Behandlung der Zellen mit Myriocin

Myriocin ist eine Substanz, die sich als potenter Inhibitor von Serin-Palmitoyltransferasen in Zellen bewährt hat. Diese Enzymklasse ist an der Sphingosinsynthese beteiligt, dem Grundbaustein der Sphingolipide. Die Zellen wurden mit Myriocin (10 μ M in Zellkulturmedium) für 48 h bei 37°C inkubiert.

3.2.3.9.6. Behandlung der Zellen mit Benzylalkohol

Benzylalkohol wurde in einer Konzentration von 40 mM in Zellkulturmedium angewendet. Die Zellen wurden bei 37°C für die angegebenen Zeiträume inkubiert.

3.2.3.10. Zellviabilitäts-Untersuchungen

Die Testung verschiedener Substanzen auf ihre Zytotoxizität wurde mithilfe des *CellTiter-Blue Cell Viability Assays* durchgeführt. Dieser Test ist eine Mikrotiterplatten- und Fluoreszenz-basierte Methode. Die im Reaktionsreagenz enthaltene Substanz Resazurin wird in lebende Zellen aufgenommen und dort zu Resorufin reduziert, welches fluoreszente Eigenschaften besitzt (Exzitation 579 nm, Emission 584 nm). So ist die Fluoreszenz der behandelten Zellen proportional zur Zellviabilität. Die Caco-2-Zellen wurden in einer 96-well-Platte ausgesät und für die entsprechenden Zeiten mit den verschiedenen Substanzen behandelt, sodass sich in jeder Vertiefung 100 μ l Volumen befanden. Es wurden je 25 μ l des *CellTiter-Blue*-Reagenzes hinzugefügt und vermischt. Nach einer einstündigen Inkubation im Brutschrank wurde die Fluoreszenz mittels Multifunktions-Plattenleser (Infinite M200, Tecan, Männedorf, Schweiz) ausgelesen.

3.2.3.11. Behandlung von Caco-2-Zellen mit Forchlorfenuron

Die Substanz Forchlorfenuron wurde 100 mM in Dimethylsulfoxid gelöst, zu 10 μ l aliquotiert und bei -20°C gelagert. Zur Behandlung von Caco-2-Zellen wurden Konzentrationen von 50 und 100 μ M verwendet. Das gelöste Forchlorfenuron wurde zu dem Kulturmedium der Zellen hinzugegeben und gut damit vermischt. In Kontrollexperimenten wurde stets Dimethylsulfoxid zur Vehikelkontrolle verwendet. Die Zellen wurden für 2,5 h vorbehandelt und anschließend für die jeweiligen Experimente verwendet.

3.2.3.12. Fluorescence activated cell sorting (FACS)

Mit dieser Methode lassen sich Zellpopulationen aufgrund ihrer fluoreszenten Eigenschaften voneinander trennen. In der vorliegenden Arbeit wurden HeLa-Zellen mit verschiedenen shRNA-Konstrukten des pSUPER.retro.gfp+neo-Vektors transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen abtrypsinisiert und in Kulturmedium resuspendiert. Aus der Suspension

(10 Mio Zellen/ml) wurden je 400.000 Zellen der unterschiedlichen Gruppen aufgrund ihrer GFP-Fluoreszenz separiert und wie unter 3.2.3.3 beschrieben lysiert. Die Sortierung der Zellen erfolgte in der zentralen FACS-Einrichtung der Universität Freiburg mithilfe eines MoFlo-Cell Sorters (Beckmann Coulter).

3.2.3.13. Statistische Methoden

Arithmetische Mittelwerte, Standardabweichungen und Standardfehler von Messergebnissen wurden mithilfe der Tabellenkalkulationssoftware Microsoft Excel bestimmt (Microsoft, Redmond, WA, USA). Signifikanztests wurden mithilfe der SigmaStat Software Version 4.0 durchgeführt (Systat Software, San Jose, CA, USA). Bevor zwei Messgruppen verglichen wurden, sind die Messwerte innerhalb der Gruppe auf ihre Normalverteilung untersucht worden. Bei Normalverteilung der Stichproben wurde ein Zweistichproben-t-Test durchgeführt. Wenn keine Normalverteilung der Stichproben gegeben war, wurde ein Wilcoxon-Mann-Whitney-Test durchgeführt. Ein Signifikanzwert $<0,05$ wurde als signifikant angesehen. Signifikante Unterschiede sind durch ein „*“ in den Abbildungen gekennzeichnet.

4. ERGEBNISSE

4.1. Untersuchungen zum Einfluss der Plasmamembranzusammensetzung auf die CDT-induzierte Ausläuferbildung

4.1.1. CDT induziert Zellausläufer in Caco-2-Zellen durch Aktin-ADP-Ribosylierung

Durch die Behandlung von Caco-2-Zellen mit CDT entstehen Mikrotubuli-basierte zelluläre Ausläufer, die eine hohe Dynamik in Bildung und Beweglichkeit aufweisen (Schwan *et al.*, 2009). Die Entstehung dieser Ausläufer ist in Abbildung 15A dargestellt. Bildausschnitte aus DIC-lebendzellmikroskopischen Untersuchungen zeigen hier die zeitabhängige Bildung der Zellfortsätze durch CDT-Behandlung, wobei die Ausläuferbildung mit den hier verwendeten CDT-Konzentrationen zwischen 30-60 min nach CDT-Behandlung begann und nach 90-120 min das Maximum erreichte. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen des Mikrotubuli- und Aktinzytoskeletts in Zellen, die mit den Aktin-ADP-ribosylierenden Toxinen CDT und C2 behandelt wurden, zeigten die Zerstörung des Aktinzytoskeletts durch die Toxine. Außerdem wurden Mikrotubuli beobachtet, die über den Zellkortex hinausragten (Abbildung 15B).

Auch nach Mikroinjektion der enzymatischen Komponente CDTa in Caco-2-Zellen und der videomikroskopischen Untersuchung der injizierten Zellen zeigte sich nach 120 min eine Ausläuferbildung, die über den Beobachtungszeitraum deutlich zunahm (Abbildung 16). Dies ließ deutlich werden, dass die Ausläuferbildung durch die Aktin-ADP-Ribosyltransferase CDTa ausgelöst wird und nicht durch die Bindung von CDTb an die Zellen oder unspezifische Effekte von CDTb auf Plasmamembran. Die Behandlung von Caco-2-Zellen mit C2-Toxin konnte die Ausläuferbildung ebenfalls induzieren. Dies belegte, dass die Bildung der Mikrotubuli-basierten Zellausläufer kein CDT-spezifischer Effekt ist, sondern durch Aktin-ADP-Ribosylierung und die damit verbundene Depolymerisation des Aktinzytoskeletts induziert wird.

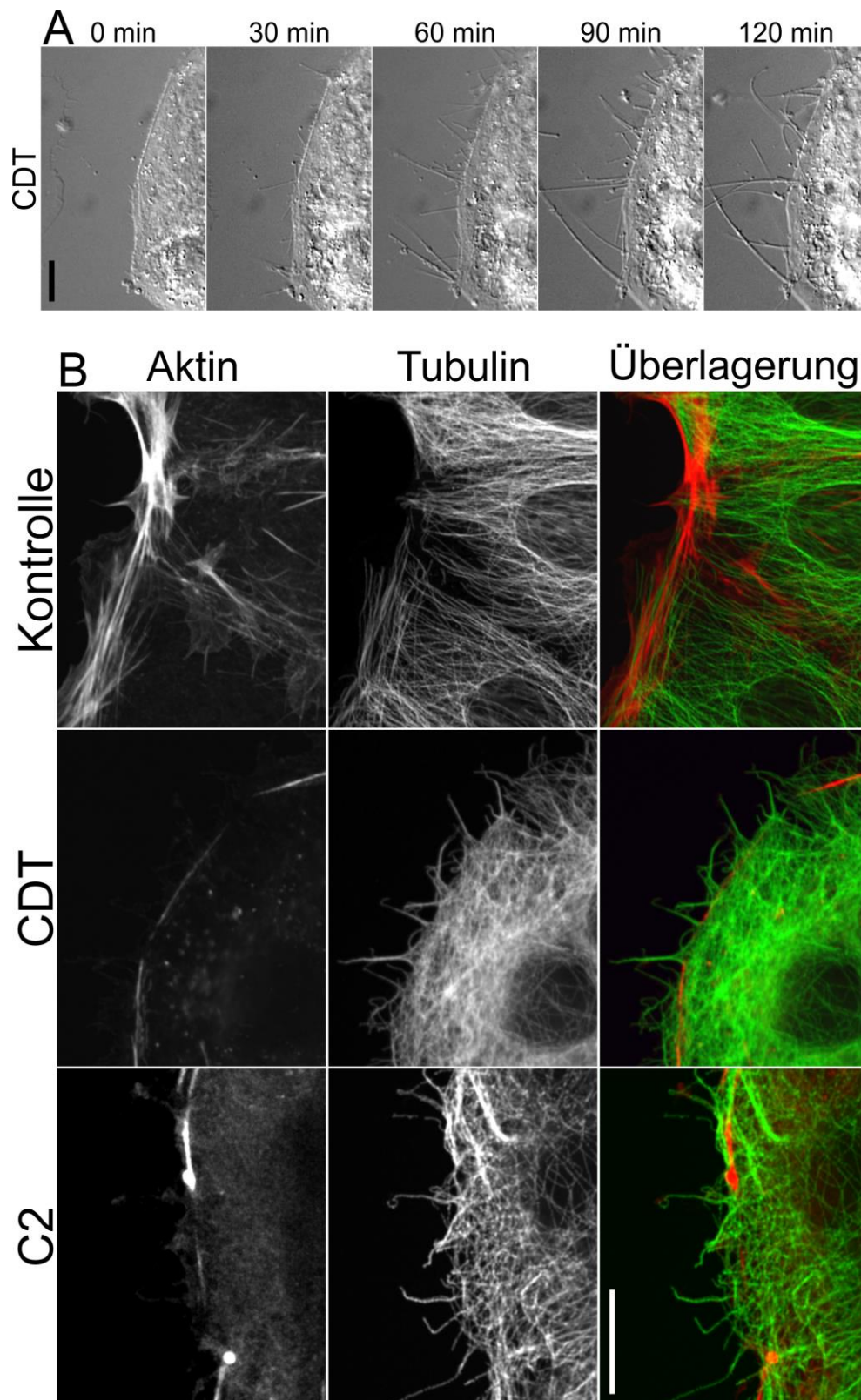


Abbildung 15: Mikrotubuli-basierte Ausläuferbildung durch Aktin-ADP-Ribosylierung in Caco-2-Zellen. (A) Bildausschnitte aus DIC-lebendzellmikroskopischen Untersuchungen subkonfluenten Caco-2-Zellen, die mit CDT behandelt wurden (200 ng/ml CDTa, 400 ng/ml CDTb). Die Ausläuferbildung wurde über 120 min beobachtet. Dargestellt sind repräsentative Bildausschnitte, über jedem Ausschnitt ist die Inkubationszeit angegeben. Der Kalibrationsbalken entspricht 10 μm . (B) Konfokale fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen subkonfluenten Caco-2-Zellen, die für 90 min mit CDT (200 ng/ml CDTa, 400 ng/ml CDTb) (CDT) oder mit C2-Toxin (300 ng/ml C2I, 600 ng/ml C2II) (C2) behandelt wurden oder unbehandelt blieben (Kontrolle). Durch indirekte Immunfluoreszenz ist das Mikrotubulizytoskelett sichtbar gemacht sowie das Aktinzytoskelett durch Phalloidin-Tetramethylrhodamin. Der Kalibrationsbalken entspricht 10 μm .

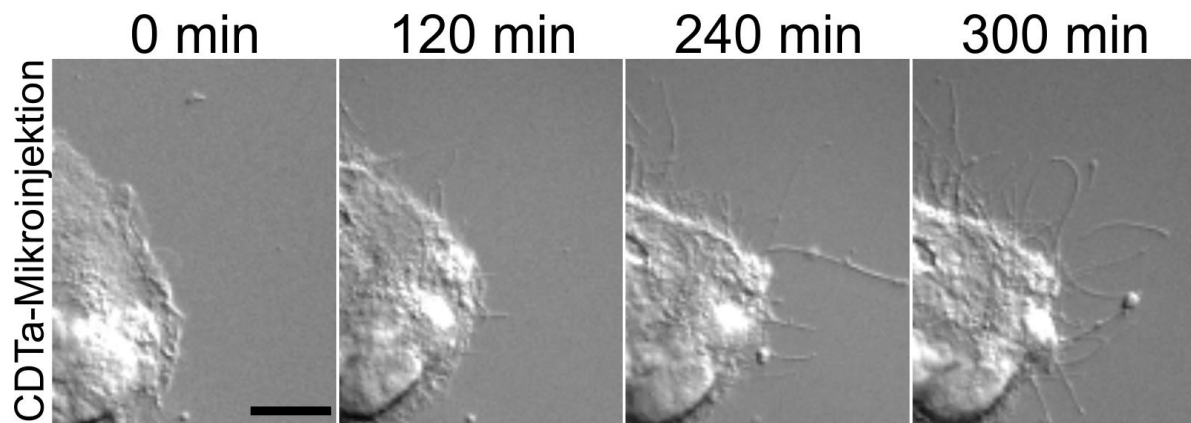


Abbildung 16: Die Mikroinjektion von CDTa in Caco-2-Zellen induziert die Bildung zellulärer Ausläufer. Gezeigt sind Bildausschnitte aus DIC-lebendzellmikroskopischen Untersuchungen subkonfluenten Caco-2-Zellen. Nach der Injektion einer CDTa-Lösung (0,5 ng/ml in PBS) wurden die Zellen über 300 min aufgenommen. Dargestellt sind repräsentative Bildausschnitte dieser Experimente, über den einzelnen Bildausschnitten ist die Zeit *post injectionem* angegeben. Der Kalibrationsbalken entspricht 10 μ m.

4.1.2. Einfluss der Cholesteroldepletion auf die Ausläuferbildung

Die Plasmamembran umhüllt die CDT-induzierten Zellausläufer. Zur Untersuchung des Einflusses der Membrankonstitution auf die Ausläuferbildung wurden zunächst Experimente mit Methyl- β -Cyclodextrin durchgeführt. Methyl- β -Cyclodextrin ist ein zyklisches Oligosaccharid, das weithin Verwendung findet, um eine Cholesteroldepletion der Plasmamembran zu bewirken (Christian *et al.*, 1997; Prydz and Simons, 2001). Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von Caco-2-Zellen zeigten einen konzentrationsabhängigen Effekt der Behandlung mit Methyl- β -Cyclodextrin auf den Membrancholesterolgehalt. Markiert wurde das Membrancholesterol durch Filipin, einem fluoreszenten Cholesterol-bindenden Polyen-Antibiotikum (Gimpl and Gehrig-Burger, 2007). Durch eine Behandlung der Zellen für 30 min mit 5 mM Methyl- β -Cyclodextrin konnte die Filipinfluoreszenz der Plasmamembran um 60 % gesenkt werden. 10 mM Methyl- β -Cyclodextrin bewirkten eine 80 %ige Reduktion der Filipinfluoreszenz und 1 mM eine circa 40 %ige Reduktion. Diese Untersuchungen zeigten eine funktionierende Cholesteroldepletion der Plasmamembran von Caco-2-Zellen durch Methyl- β -Cyclodextrin (Abbildung 17).

Zur Messung des Effekts der Cholesteroldepletion auf die CDT-induzierte Ausläuferbildung wurden DIC-lebendzellmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Hierfür wurden subkonfluente Caco-2-Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen (1-10 mM) von Methyl- β -Cyclodextrin für 30 min behandelt oder blieben unbehandelt. Nach der Zugabe von CDT wurde die Ausläuferbildung für 120 min aufgenommen und ausgewertet (Abbildung 18). Die so behandelten Zellen wiesen keine wesentlichen morphologischen Unterschiede zu

den Kontrollzellen auf. Zu beobachten war jedoch eine verminderte Ausläuferbildung (Abbildung 18A). Die Ergebnisse der Messung der relativen Ausläuferbildung (μm Ausläufer/ μm Zellumfang) aus diesen Experimenten stellt Abbildung 18B dar. Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Hemmung der Ausläuferbildung mit nur geringem Einfluss auf ihren Beginn. In mit 5 mM Methyl- β -Cyclodextrin vorbehandelten Caco-2-Zellen war eine Reduktion der CDT-induzierten Ausläuferbildung um etwa 80 % nach 120 min messbar. Auswertungen der Anzahl der gebildeten Ausläufer und der durchschnittlichen Länge der Ausläufer nach Vorbehandlung mit 5 mM Methyl- β -Cyclodextrin im Vergleich zu unbehandelten Zellen sind in Abbildung 18C und D dargestellt. Im Vergleich der beiden Parameter, die beide in die Messung der relativen Ausläuferbildung eingegangen sind, zeigte sich eine überwiegende Reduktion der Ausläuferanzahl durch die Cholesteroldepletion.

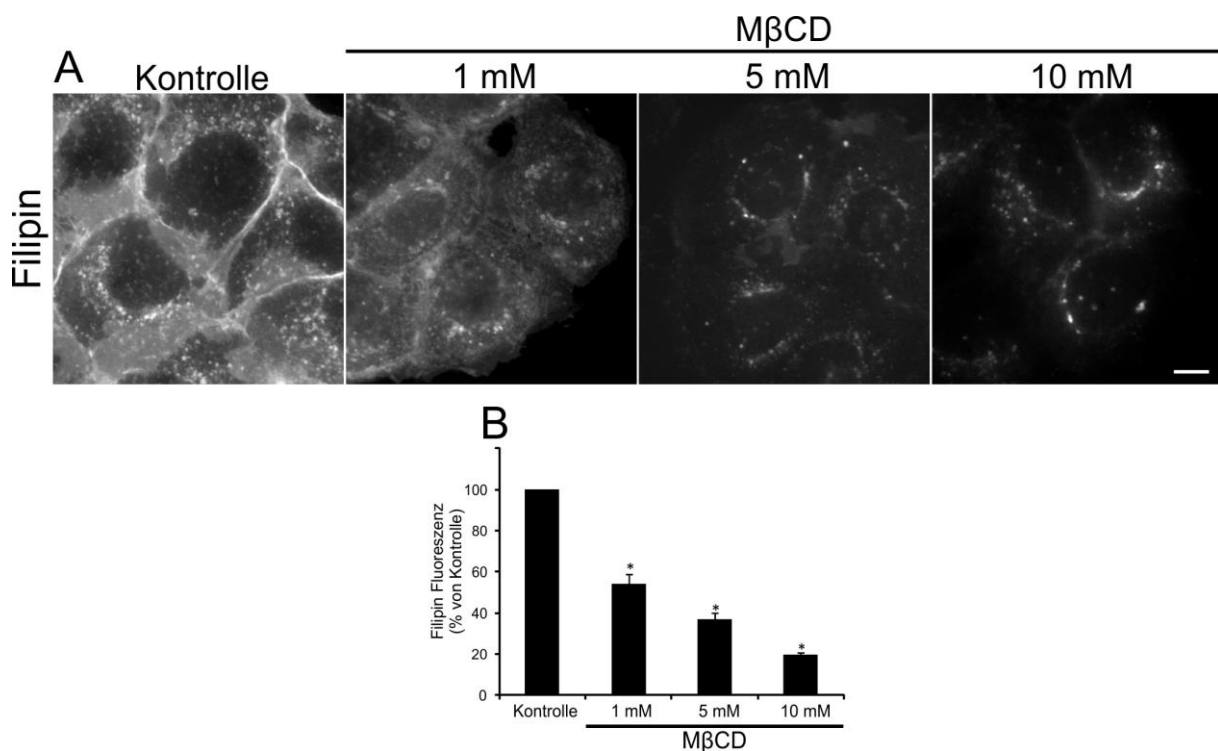


Abbildung 17: Cholesteroldepletion der Plasmamembran durch Methyl- β -Cyclodextrin in Caco-2-Zellen. (A) Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von subkonfluenten Caco-2-Zellen, die für 30 min mit aufsteigenden Konzentrationen von Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD, 1-10 mM) behandelt wurden oder unbehandelt blieben (Kontrolle). Zur Darstellung des Plasmamembrancholesterolgehalts wurden die Zellen nach der Fixierung mit einer Filipinlösung inkubiert. Dargestellt sind repräsentative Bildausschnitte dieser Experimente. Der Kalibrationsbalken entspricht 5 μm . (B) Darstellung der Fluoreszenzintensität des Filipins aus den in A beschriebenen Experimenten. Im Säulendiagramm sind die durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten der Zellen in % der Kontrolle dargestellt. Die Fehlerindikatoren stellen den Standardfehler der Messungen von ≥ 20 Zellen dar. Signifikante Unterschiede zwischen den Stichproben und der Kontrolle sind durch ein „*“ markiert.

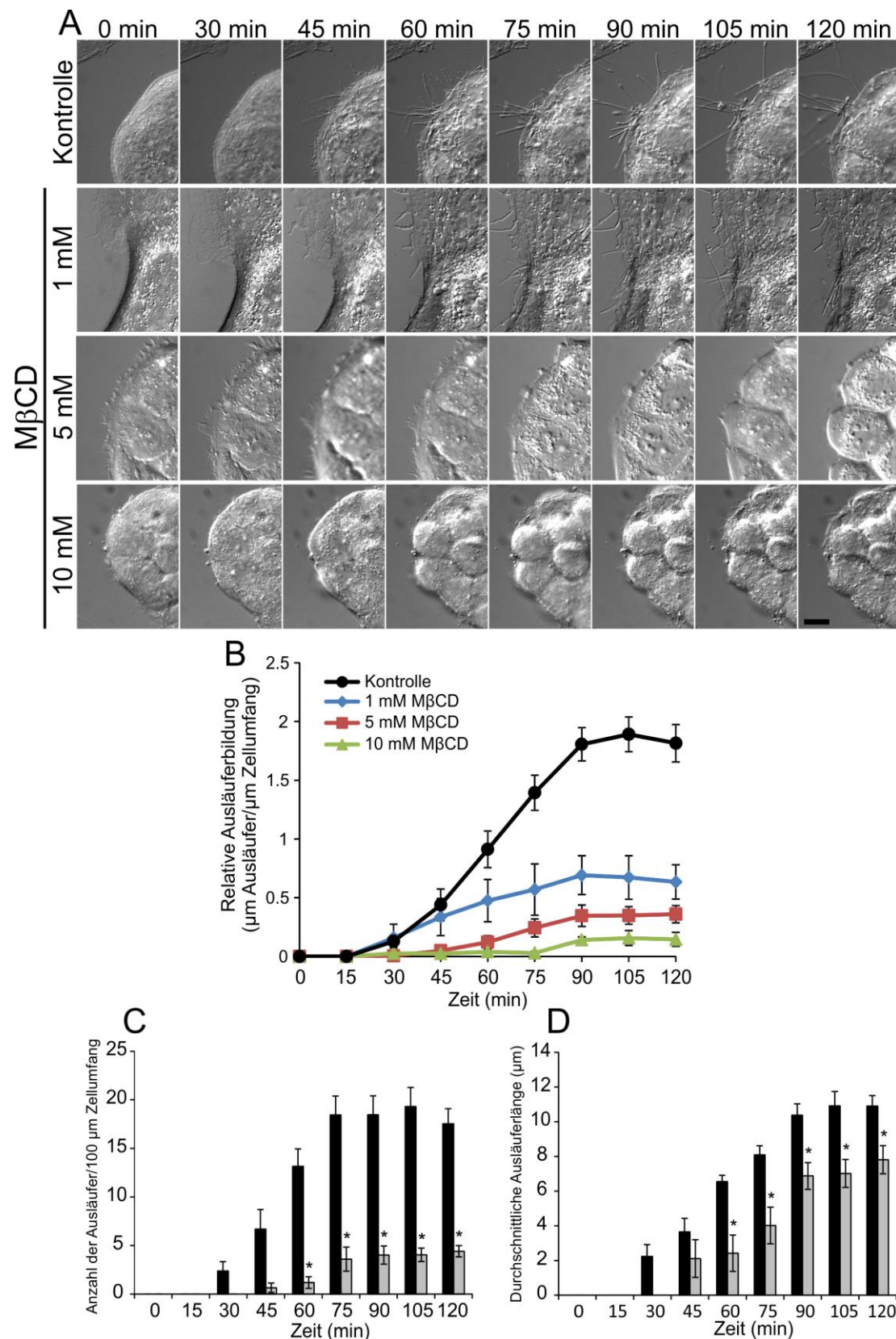


Abbildung 18: Die Behandlung von Caco-2-Zellen mit Methyl- β -Cyclodextrin hemmt die CDT-induzierte Ausläuferbildung. (A) Bildausschnitte aus DIC-lebendzellmikroskopischen Experimenten mit subkonfluenten Caco-2-Zellen, die mit aufsteigenden Konzentrationen von Methyl- β -Cyclodextrin behandelt wurden (1-10 mM) oder unbehandelt blieben (Kontrolle). Anschließend wurden die Zellen mit CDT behandelt (200 ng/ml CDTa, 400 ng/ml CDTb) und die Ausläuferbildung für 120 min aufgenommen. Dargestellt sind repräsentative Bildausschnitte aus diesen Experimenten. Für jeden Bildausschnitt ist die jeweilige Inkubationszeit und die Methyl- β -Cyclodextrin-Konzentration

angegeben. Der Kalibrationsbalken entspricht 10 μm . **(B)** Quantifizierung der Ausläuferbildung aus verschiedenen DIC-lebendzellmikroskopischen Experimenten nach CDT-Behandlung (200 ng/ml CDTa, 400 ng/ml CDTb). Alle 15 min wurde die Länge der gebildeten Ausläufer summiert und gegen den Zellumfang normalisiert, dargestellt als relative Ausläuferbildung (μm Ausläufer/ μm Zellumfang). Dargestellt ist der Effekt der unterschiedlichen Methyl- β -Cyclodextrin-Konzentrationen auf die Ausläuferbildung (blau: 1 mM, rot: 5 mM, grün: 10 mM). Als schwarze Kurve ist die Ausläuferbildung der Kontrollzellen dargestellt. **(C)** Quantifizierung der Ausläuferbildung. Alle 15 min wurden die Ausläufer gezählt und gegen 100 μm Zellumfang normalisiert. Dargestellt als Anzahl der Ausläufer/100 μm Zellumfang. Gemessen wurde die Ausläuferanzahl in subkonfluenten Caco-2-Zellen, die mit 5 mM Methyl- β -Cyclodextrin für 30 min vorbehandelt wurden (graue Balken) oder unbehandelt blieben (schwarze Balken). Sie wurden je mit 200 ng/ml CDTa und 400 ng/ml CDTb behandelt. **(D)** Quantifizierung der Ausläuferbildung. Alle 15 min wurde die Länge der gebildeten Ausläufer summiert und durch ihre Anzahl dividiert. Dargestellt als durchschnittliche Ausläuferlänge in μm . Gemessen wurde die Ausläuferlänge in subkonfluenten Caco-2-Zellen, die mit 5 mM Methyl- β -Cyclodextrin für 30 min vorbehandelt wurden (graue Balken) oder unbehandelt blieben (schwarze Balken). Sie wurden je mit 200 ng/ml CDTa und 400 ng/ml CDTb behandelt. Die Fehlerindikatoren in B, C und D stellen den Standardfehler von ≥ 5 Positionen mit ≥ 2 Zellen je Position aus 3 Experimenten dar. Signifikante Unterschiede zwischen den Stichproben und den Kontrollen sind durch ein „*“ markiert.

4.1.3. Einfluss der Cholesterolrepletion auf die Ausläuferbildung

Als nächstes wurde die Rolle des Membrancholesterols bei der Ausläuferbildung durch Cholesterolrepletion mittels Methyl- β -Cyclodextrin-Cholesterol-Komplexen untersucht, einer weithin verbreiteten Methode, um die Plasmamembran mit Cholesterol anzureichern (Jones *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2013). DIC-lebendzellmikroskopische Untersuchungen Cholesterol-depletierter Caco-2-Zellen zeigten, dass nach 60 min Inkubation mit CDT und anschließender Zugabe von Cholesterol-Methyl- β -Cyclodextrin-Komplexen die Ausläuferbildung prompt einsetzte und rapide fortschritt (Abbildung 19A). Messungen der relativen Ausläuferbildung (μm Ausläufer/ μm Zellumfang) aus diesen Experimenten sind in Abbildung 19B und C grafisch dargestellt. Nach Rekonstitution des Membrancholesterols war ein prompter und deutlicher Anstieg der Ausläuferbildung messbar, diese verhielt sich terminal überschießend. Abbildung 19C zeigt die lineare Phase der Ausläuferbildung nach Cholesterolrepletion und von Kontrollzellen. Der Vergleich der Ausgleichsgeraden der beiden Kurven ließ eine zwei- bis dreifach so hohe Geschwindigkeit der Ausläuferbildung nach Cholesterolrepletion erkennbar werden.

Ebenfalls wurde der Einfluss der Cholesteroldepletion nach Beginn der Ausläuferbildung auf deren Fortgang untersucht. Hierfür wurden subkonfluente Caco-2-Zellen videomikroskopisch untersucht und nach Beginn der CDT-induzierten Ausläuferbildung mit 5 mM Methyl- β -Cyclodextrin für 30 min behandelt. Währenddessen wurde die Ausläuferbildung weiter aufgenommen. Die relative Ausläuferbildung der so behandelten Caco-2-Zellen wurde gemessen und ist in Abbildung 19B dargestellt. Die Cholesteroldepletion erfolgte 30 min nach CDT-Zugabe. Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass der hemmende Effekt der Methyl- β -Cyclodextrin-Behandlung auf die CDT-induzierte Ausläuferbildung durch das Wiedereinbringen von Cholesterol in die Plasmamembran aufgehoben werden konnte. Dabei

hatte Cholesterol eine Schalterfunktion für die Ausläuferbildung. Die Behandlung der Caco-2-Zellen mit Methyl- β -Cyclodextrin nach Beginn der Ausläuferbildung verursachte eine Stagnation der Ausläuferbildung. Dies machte deutlich, dass Membrancholesterol für den Fortgang dieses Prozesses benötigt wird.

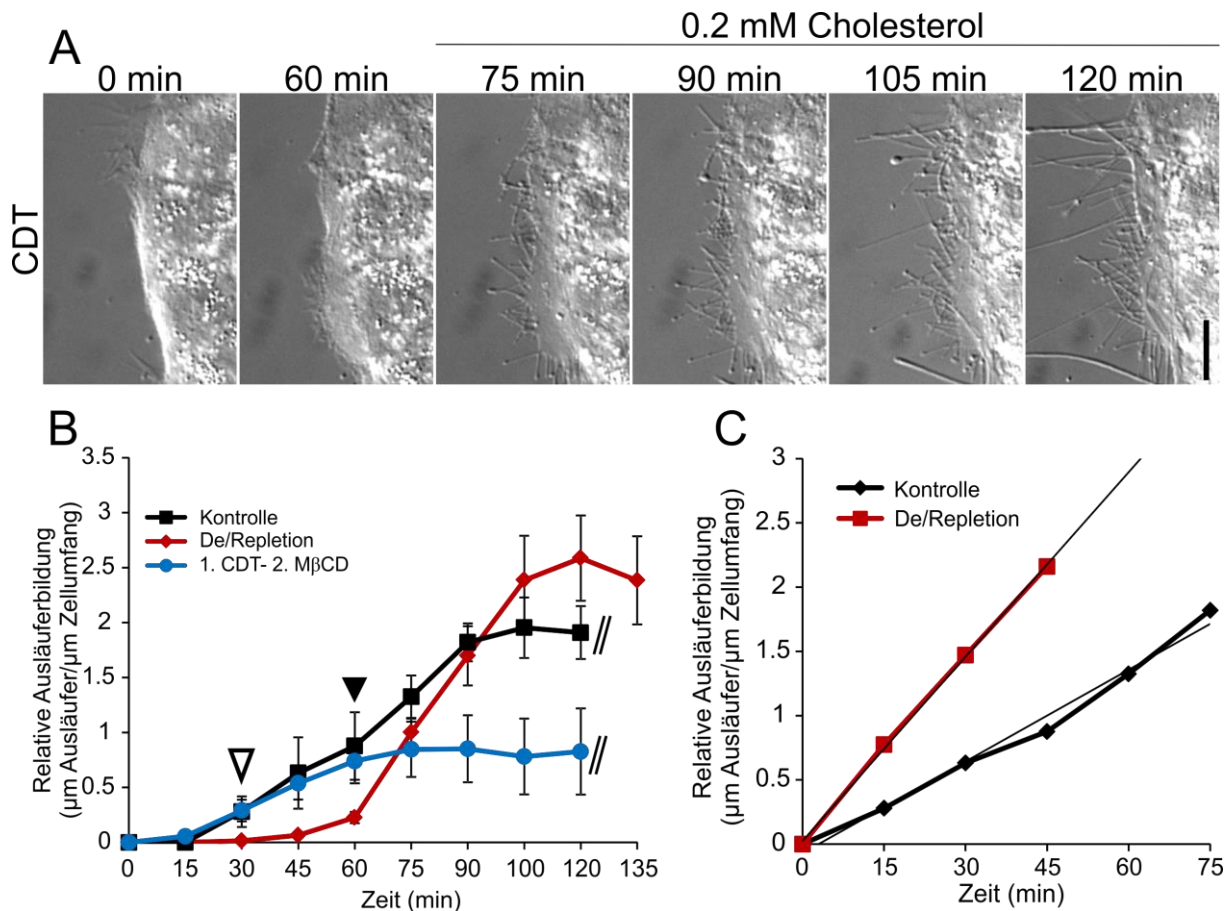


Abbildung 19: Effekt der Cholesterolrepletion auf die Bildung CDT-induzierter zellulärer Ausläufer in Caco-2-Zellen. (A) Ausschnitte aus DIC-lebendzellmikroskopischen Aufnahmen subkonfluenter Caco-2-Zellen, die für 30 min mit 5 mM Methyl- β -Cyclodextrin und im Anschluss mit CDT behandelt wurden (200 ng/ml CDTa, 400 ng/ml CDTb). Nach 60-minütiger Videomikroskopie wurden die Zellen mit Cholesterol-Methyl- β -Cyclodextrin-Komplexen (0,2 mM) behandelt, um das Plasmamembrancholesterol zu rekonstituieren. Über den Bildausschnitten ist die jeweilige CDT-Behandlungsdauer sowie die Cholesterolrepletion angegeben. Der Kalibrationsbalken entspricht 10 μm . (B) Quantifizierung der Ausläuferbildung aus verschiedenen DIC-lebendzellmikroskopischen Experimenten nach CDT-Behandlung (200 ng/ml CDTa, 400 ng/ml CDTb). Die Länge der Ausläufer wurde alle 15 min addiert und durch den Zellumfang dividiert, dargestellt als relative Ausläuferbildung (μm Ausläufer/ μm Zellumfang). Die schwarze Kurve stellt die Ausläuferbildung subkonfluenter Caco-2-Zellen unter Kontrollbedingungen dar. Die blaue Kurve stellt die Ausläuferbildung in subkonfluente Caco-2-Zellen dar, die zunächst mit CDT vergiftet wurden und nach der Beobachtung der ersten Ausläufer mit 5 mM Methyl- β -Cyclodextrin (leerer Pfeil) behandelt wurden. Die rote Kurve veranschaulicht die Ausläuferbildung subkonfluenter Caco-2-Zellen, die vor der CDT-Behandlung mit 5 mM Methyl- β -Cyclodextrin für 30 min inkubiert wurden. Nach 60 min CDT-Behandlung wurden Methyl- β -Cyclodextrin-Cholesterol-Komplexe (0,2 mM) hinzugegeben (gefüllter Pfeil), um das Plasmamembrancholesterol zu rekonstituieren. Die Fehlerindikatoren stellen den Standardfehler von ≥ 5 Positionen mit ≥ 2 Zellen je Position aus 3 Experimenten dar. (C) Daten aus B, die die Ausläuferbildung in der linearen Phase zwischen den Kontrollzellen und den Zellen, deren Membrancholesterol rekonstituiert wurde, darstellen.

4.1.4. Einfluss der Cholesterolmanipulation auf das Mikrotubuli- und Aktinzytoskelett

Nähere Untersuchungen zum Effekt der Cholesterolmanipulation auf das Zytoskelett der verwendeten Caco-2-Zellen sollten zeigen, ob das Mikrotubuli- und Aktinzytoskelett durch die Behandlung mit Methyl- β -Cyclodextrin beeinflusst wurden und ob es eine Wirkung auf CDT-spezifische zytoskelettale Effekte gab. In fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen des Mikrotubuli- und Aktinzytoskelett von Caco-2-Zellen zeigte sich kein Effekt auf die Struktur und Organisation dieser zytoskelettalen Komponenten durch Behandlung mit Methyl- β -Cyclodextrin (Abbildung 20).

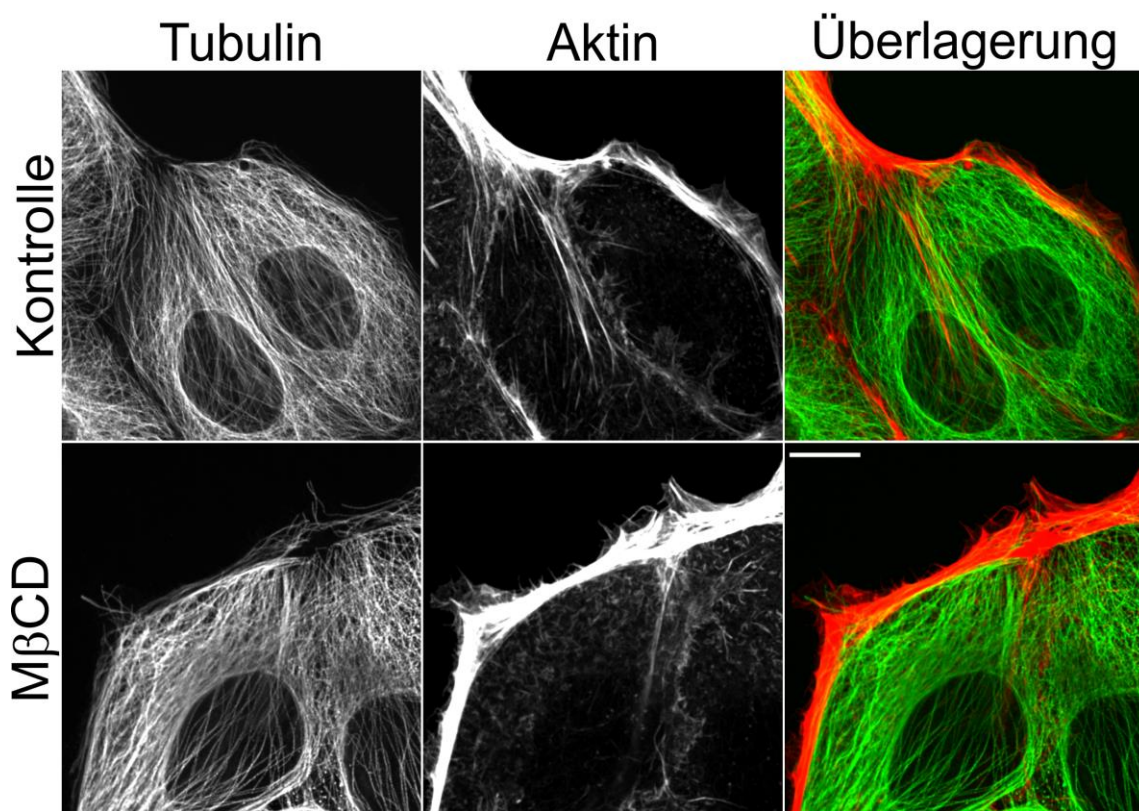


Abbildung 20: Effekte der Cholesteroldepletion auf das Aktin- und Mikrotubulizytoskelett in Caco-2-Zellen. Konfokale fluoreszenzmikroskopische Darstellung des Mikrotubulizytoskeletts durch indirekte Immunfluoreszenz und des Aktinzytoskeletts durch Phalloidin-Tetramethylrhodamin. Subkonfluente Caco-2-Zellen wurden für 30 min mit 5 mM Methyl- β -Cyclodextrin behandelt (M β CD) oder blieben unbehandelt (Kontrolle). Anschließend wurden die Zellen fixiert und gefärbt. Der Kalibrierungsbalken entspricht 10 μ m.

CDT hat spezifische Effekte auf die Mikrotubulipolymerisation (Schwan *et al.*, 2009). Es wurde beschrieben, dass CDT zu einer vermehrten Polymerisation der Mikrotubuli in der Peripherie und einer verminderten Polymerisation im Inneren von Caco-2-Zellen führt. Um einen möglichen Einfluss von Methyl- β -Cyclodextrin auf die Mikrotubulipolymerisation in CDT-behandelten und unbehandelten Zellen zu untersuchen, wurden Caco-2-Zellen mit EB3-GFP Plasmid-DNA transfiziert. EB3 bindet an die +Enden polymerisierender Mikrotubuli. Dies ermöglichte die Untersuchung der Mikrotubulipolymerisation. Abbildung 21A zeigt repräsentative Projektionen von Polymerisationsrouten der Mikrotubuli aus diesen Experimenten, die aus jeweils 3-minütigen videomikroskopischen Untersuchungen erstellt wurden. Bei den Untersuchungen konnte kein Einfluss von Methyl- β -Cyclodextrin beobachtet werden.

Weitere Wirkungen von CDT auf die Mikrotubulipolymerisation sind die Verlangsamung der Polymerisationsgeschwindigkeit sowie eine Verlängerung der Zeit, in der sich Mikrotubuli in der Polymerisationsphase befinden (Schwan *et al.*, 2009). Abbildung 21B und Abbildung 21C zeigen die Messungen zum Einfluss von Methyl- β -Cyclodextrin auf diese Effekte. Hierfür wurden Caco-2-Zellen mit EB3-GFP Plasmid-DNA transfiziert und die Zellen mit CDT behandelt oder unbehandelt belassen. Nach 90 min wurde die EB3-GFP-Fluoreszenz aufgenommen und die beschriebenen Polymerisationsparameter bestimmt. Während ein signifikanter Einfluss von CDT auf die Polymerisationsgeschwindigkeit und die Polymerisationszeit beobachtet wurde, konnte kein Einfluss von Methyl- β -Cyclodextrin auf diese Polymerisationsparameter festgestellt werden.

Fluoreszenzmikroskopische Messungen des Mikrotubulizytoskeletts von Caco-2-Zellen zeigten einen Einfluss von Methyl- β -Cyclodextrin auf die subkortikale Dichte der Mikrotubuli nach CDT-Behandlung. Hierfür wurden die Zellen mit Methyl- β -Cyclodextrin vorbehandelt oder unbehandelt belassen und anschließend mit CDT vergiftet. Zusätzlich wurde eine Gruppe nach 60-minütiger CDT-Behandlung Cholesterol-repletiert. Nach 90-minütiger CDT-Behandlung wurden die Zellen fixiert und das Mikrotubuli- und Aktinzytoskelett fluoreszent markiert. Bei Messungen der Mikrotubulifluoreszenz in einem subkortikalen Bereich von 5 μ m zeigte sich eine Verdopplung der Fluoreszenzintensität durch die CDT-Behandlung. In CDT-behandelten Zellen, die vorher Cholesterol-depletiert worden waren, war die subkortikale Mikrotubulifluoreszenz noch einmal um etwa 50 % erhöht (Abbildung 22B). In den Cholesterol-depletierten Zellen waren weniger Mikrotubuli zu beobachten, die den Zellkortex überragten, und es zeigten sich vermehrt gekrümmte Mikrotubuli am Zellkortex (Abbildung 22A). Bei den beschriebenen Untersuchungen ließen

sich keine Effekte von Methyl- β -Cyclodextrin beobachten, die dessen hemmende Wirkung auf die CDT-induzierte Ausläuferbildung erklären konnten. Durch die Darstellung des Aktinzytoskeletts mittels Phalloidin-Tetramethylrhodamin war zu beobachten, dass in Methyl- β -Cyclodextrin behandelten Zellen CDT im gleichen Maße zur Zerstörung des Aktinzytoskeletts führte wie in den Kontrollzellen (Abbildung 22A).

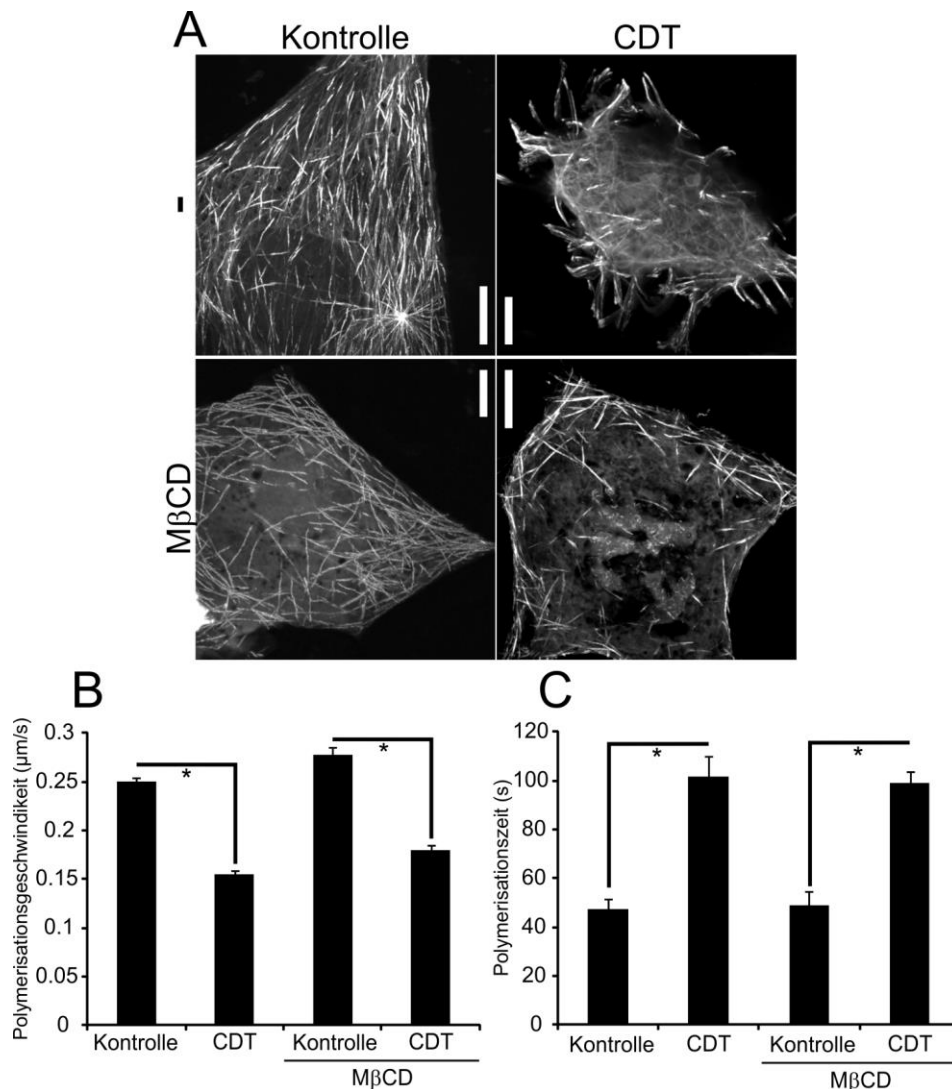


Abbildung 21: Einfluss von Methyl- β -Cyclodextrin auf die Mikrotubulipolymerisation in CDT-behandelten und unbehandelten Zellen. (A) Fluoreszenzmikroskopische Projektionen aus videomikroskopischen Experimenten mit subkonfluenten Caco-2-Zellen. Die Zellen wurden mit EB3-GFP transfiziert und 90 min nach CDT-Behandlung (200 ng/ml CDTa, 400 ng/ml CDTb) (CDT) oder unbehandelt (Kontrolle) aufgenommen. Die Zellen wurden vorher mit 5 mM Methyl- β -Cyclodextrin für 30 min inkubiert (M β CD) oder blieben unbehandelt (-). Dargestellt ist jeweils eine repräsentative Projektion der EB3-GFP-Fluoreszenz aus je 3 min Videosequenz (Framerate: 3 s), sodass die Polymerisationsrouten der Mikrotubuli unter den verschiedenen Bedingungen sichtbar werden. Die Kalibrationsbalken entsprechen 10 μm . (B) Dargestellt ist der Einfluss der Methyl- β -Cyclodextrin-Behandlung auf die Polymerisationsgeschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$) von Mikrotubuli mit und ohne CDT-Vergiftung im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die Zellen wurden behandelt wie unter A beschrieben. Gemessen wurden je Gruppe ≥ 50 EB3-GFP-positive Mikrotubuli aus 5 unabhängigen Experimenten. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an. (C) Dargestellt ist der Einfluss der Methyl- β -Cyclodextrin-Behandlung auf die Polymerisationszeit (s) von Mikrotubuli mit und ohne CDT-Vergiftung im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Gemessen wurde die Zeit im Wachstum von ≥ 25 EB3-GFP-positiven Mikrotubuli je Gruppe. Die Zellen wurden behandelt wie unter A beschrieben. Die Fehlerindikatoren stellen den Standardfehler aus ≥ 4 unabhängigen Experimenten dar. In B und C sind signifikante Unterschiede zwischen den Stichproben und den Kontrollen durch ein „*“ markiert.

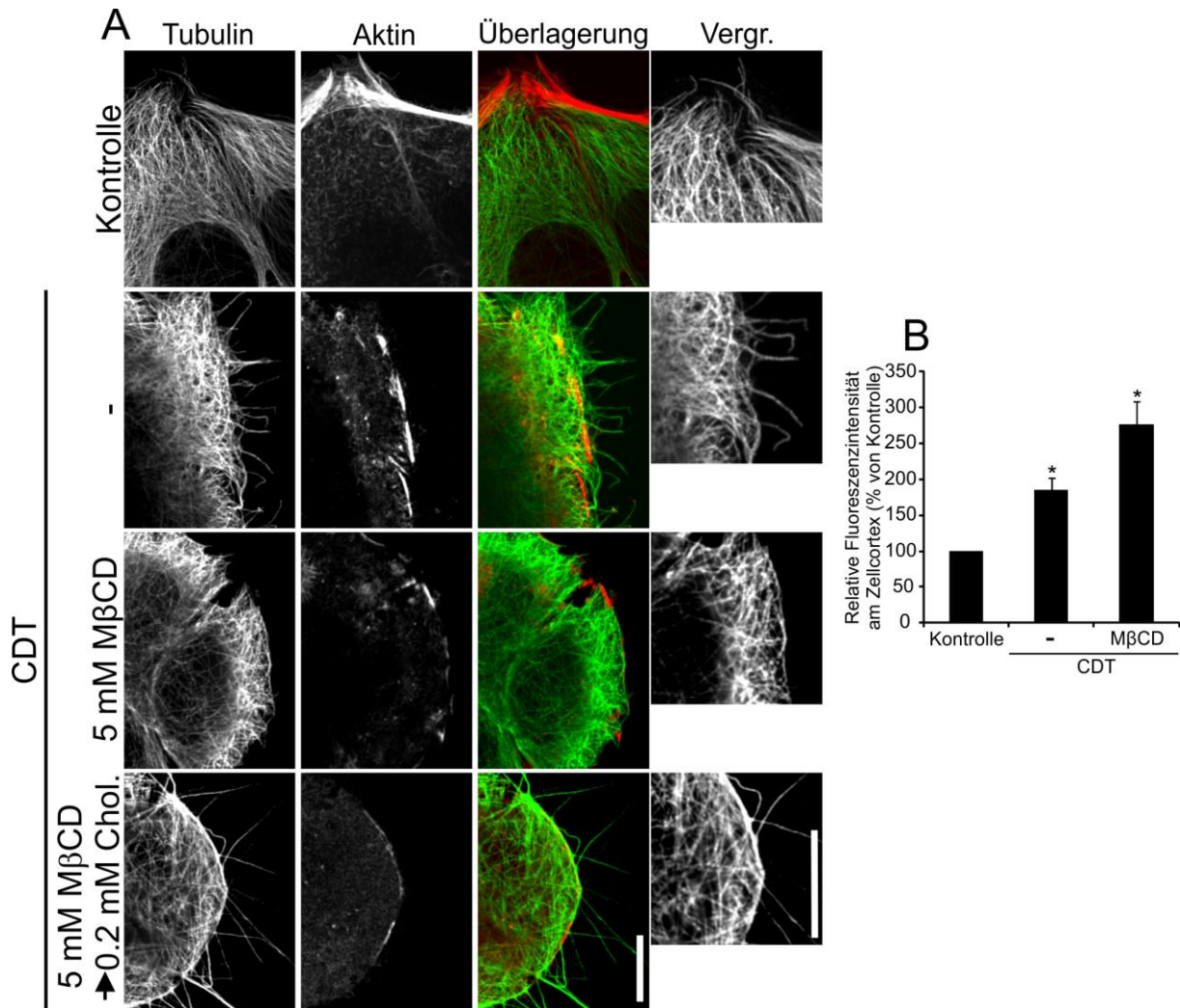


Abbildung 22: Einfluss von Methyl-β-Cyclodextrin auf das Mikrotubulizytoskelett am Zellkortex. (A) Konfokale Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von subkonfluenten Caco-2-Zellen. Dargestellt ist das Mikrotubulizytoskelett durch indirekte Immunfluoreszenz und das Aktinzytoskelett durch Phalloidin-Tetramethylrhodamin. Die vergrößerten Ausschnitte zeigen Bereiche des kortikalen Mikrotubulizytoskeletts. Die Zellen wurden für 90 min mit CDT behandelt (200 ng/ml CDTa, 400 ng/ml CDTb) oder blieben unbehandelt (Kontrolle). Die CDT-behandelten Zellen wurden vorher mit 5 mM Methyl-β-Cyclodextrin für 30 min behandelt (5 mM MβCD) oder blieben unbehandelt (-). Die Zellen in der unteren Zeile der Abbildung wurden nach 60-minütiger CDT-Behandlung mit Cholesterol-Methyl-β-Cyclodextrin-Komplexen behandelt (0,2 mM). Die Kalibrationsbalken stellen 10 μm dar. (B) Darstellung der Messung der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität am zellulären Kortex in % der Kontrolle. Die Zellen wurden behandelt wie unter A beschrieben. Gemessen wurde die Mikrotubulifluoreszenz in einem subkortikalen Bereich von 5 μm von ≥25 Zellen je Gruppe aus 3 unabhängigen Experimenten. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an. Signifikante Unterschiede zwischen den Stichproben und der Kontrolle sind durch ein „*“ markiert.

4.1.5. Einfluss von Methyl- β -Cyclodextrin auf die Aufnahme und Aktivität von CDT

Weitere Untersuchungen sollten zeigen, ob die Aufnahme von CDT in Caco-2-Zellen durch Methyl- β -Cyclodextrin beeinflusst wird oder Methyl- β -Cyclodextrin die enzymatische Aktivität von CDT hemmt. Hierfür wurden Caco-2-Zellen mit Methyl- β -Cyclodextrin behandelt oder unbehandelt belassen. Die Zellen wurden auf 4°C gekühlt und es wurde Alexa 568-markiertes CDTa (1 μ g/ml) und unmarkiertes CDTb (2 μ g/ml) hinzugegeben und für 15 min inkubiert. Dadurch wurde die Bindung der fluoreszenzmarkierten Toxin-Komplexe an die Zellen bewirkt. Im Anschluss wurden die Zellen auf 37°C erwärmt und so die Endozytose der Toxin-Komplexe ausgelöst. Nach 20 min Inkubation bei 37°C wurden die Zellen fixiert und immunzytochemisch behandelt. Durch dieses Verfahren findet eine visualisierbare Anreicherung der Toxin-Komplexe im frühen endosomalen Kompartiment statt. In diesen mikroskopischen Untersuchungen zeigte sich Alexa 568-markiertes CDTa gleichermaßen in Rab5-positiven Endosomen von Methyl- β -Cyclodextrin behandelten Zellen und Kontrollzellen (Abbildung 23).

Der Einfluss von Methyl- β -Cyclodextrin auf die Aufnahme von CDT in Caco-2-Zellen und dessen intrazelluläre Aktivität wurde mittels ADP-Nachribosylierung untersucht. Es zeigte sich kein maßgeblicher Effekt durch die Behandlung mit Methyl- β -Cyclodextrin (5 mM) auf die Aktin-ADP-Ribosylierung nach 1 h und 2 h CDT-Behandlung (Abbildung 24A). Durch ADP-Ribosylierungsexperimente wurde ebenfalls ein Einfluss von Methyl- β -Cyclodextrin auf die CDTa-Aktivität in vitro untersucht. Hierfür wurde in Anwesenheit von aufsteigenden Methyl- β -Cyclodextrin-Konzentrationen aufgereinigtes Aktin durch CDTa modifiziert (Abbildung 24B). Es zeigte sich kein maßgeblicher Einfluss von Methyl- β -Cyclodextrin auf die CDTa-Aktivität. Mit den durchgeführten Untersuchungen konnte eine Beeinflussung der Aufnahme von CDT und dessen Aktin-ADP-Ribosylierung in Caco-2-Zellen durch Methyl- β -Cyclodextrin ausgeschlossen werden. Es zeigte sich auch keine Wirkung von Methyl- β -Cyclodextrin auf die CDTa-Aktivität bei der Modifikation von aufgereinigtem Aktin.

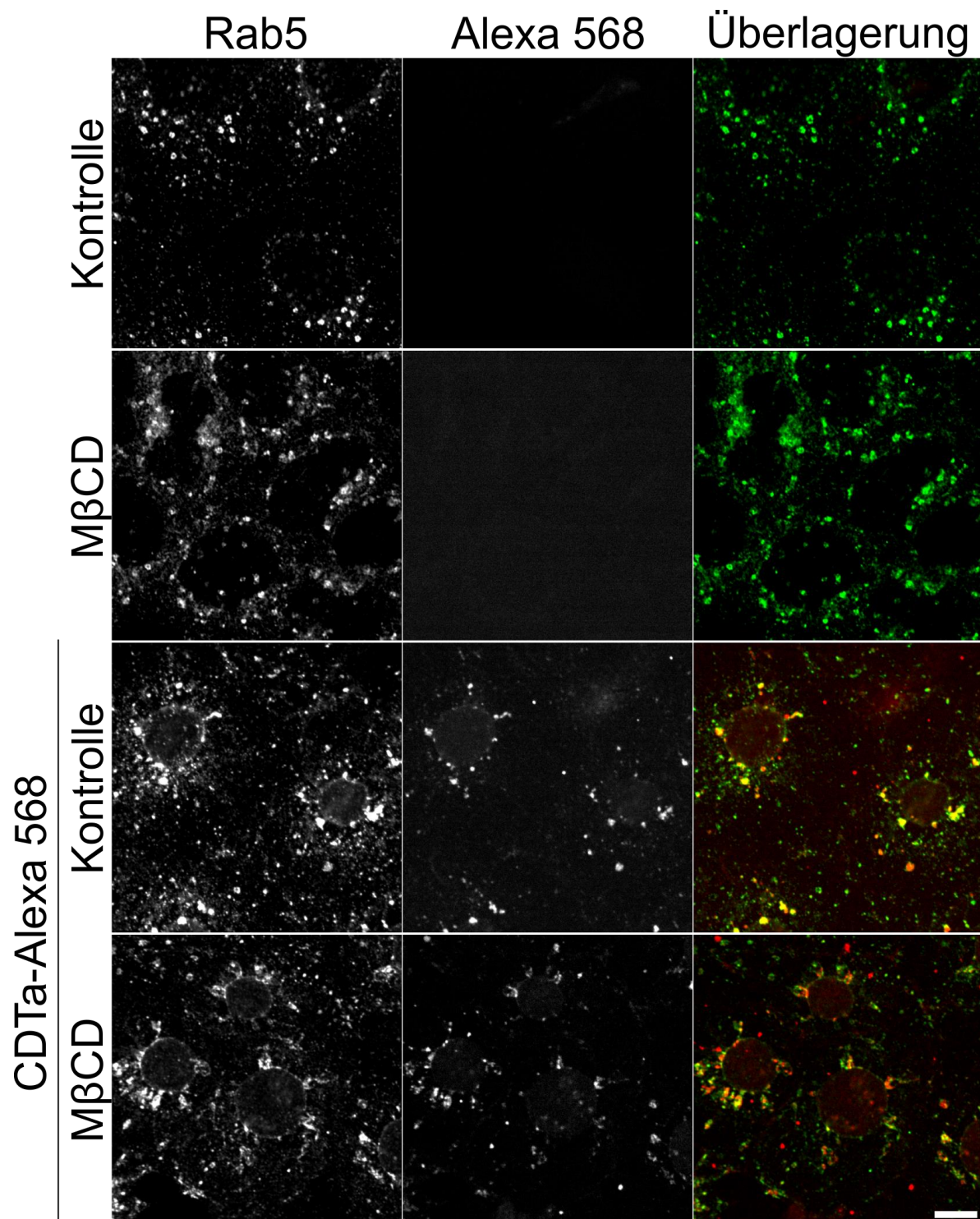


Abbildung 23: Einfluss von Methyl-β-Cyclodextrin auf die Aufnahme von CDT in Caco-2-Zellen. Die konfokalen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen die GTPase Rab5 als Marker für das frühe endosomale Kompartiment, die durch indirekte Immunfluoreszenz sichtbar gemacht wurde, und Alexa 568-markiertes CDTa. Subkonfluente Caco-2-Zellen wurden mit 5 mM Methyl-β-Cyclodextrin für 30 min behandelt (MβCD) oder unbehandelt gelassen (Kontrolle). Im Anschluss wurden die Zellen auf 4°C herabgekühlt und mit 1 µg/ml Alexa 568-markiertem CDTa und 2 µg/ml unmarkiertem CDTb behandelt. Nach 15 min wurden die Zellen auf 37°C erwärmt und für 20 min inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen fixiert und immunzytologisch behandelt. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte aus den beschriebenen Experimenten. Der Kalibrationsbalken entspricht 10 µm.

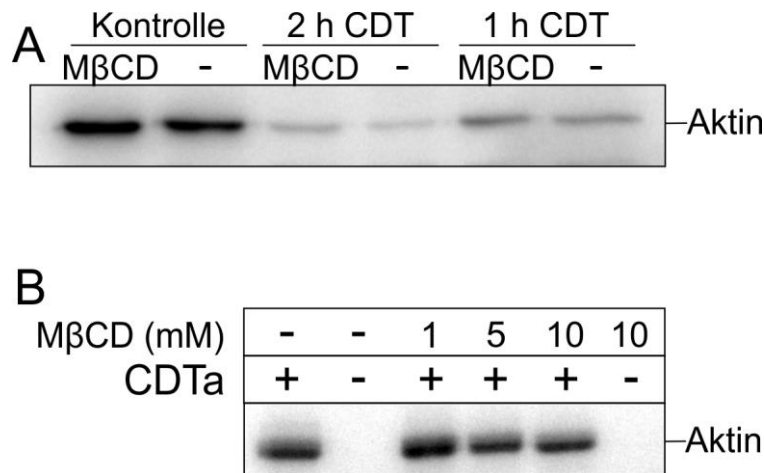


Abbildung 24: Einfluss von Methyl-β-Cyclodextrin auf die Aufnahme und die enzymatische Aktivität von CDT, gemessen in Caco-2-Zellen sowie mit aufgereinigtem Aktin. (A) Abgebildet ist ein repräsentatives Autoradiogramm eines ADP-Nachribosylierungsexperiments. Konfluente Caco-2-Zellen wurden mit 5 mM Methyl-β-Cyclodextrin (MβCD) für 30 min behandelt oder unbehandelt gelassen (-). Die Zellen wurden für die angegebene Zeit mit CDT behandelt (200 ng/ml CDTa, 400 ng/ml CDTb) oder unbehandelt belassen (Kontrolle). Im Anschluss wurden die Zellen lysiert und das unmodifizierte G-Aktin durch C2I in Anwesenheit von [³²P]NAD „nachribosyliert“. Durch SDS-PAGE wurden die Reaktionsansätze aufgetrennt und das Acrylamidgel mittels Phosphorimager ausgelesen. (B) Dargestellt ist ein repräsentatives Autoradiogramm eines in vitro-ADP-Ribosylierungsexperiments. In Anwesenheit aufsteigender Konzentrationen (1-10 mM) von Methyl-β-Cyclodextrin (MβCD) oder in dessen Abwesenheit (-) wurden 2 µg aufgereinigtes Aktin mit 400 ng CDTa (+) oder ohne CDTa (-) zusammen mit [³²P]NAD in 40 µl ADP-Ribosylierungspuffer für 20 min inkubiert. Per SDS-PAGE wurden die Proben aufgetrennt und das Acrylamidgel per Phosphorimager ausgelesen.

4.1.6. Störung der Membrankonstitution durch Sphingomyelinase, Myriocin, Nystatin und Benzylalkohol

In der Plasmamembran ist Cholesterol mitverantwortlich für die Organisation sogenannter *lipid rafts*. Diese Membrandomänen bestehen neben Cholesterol aus Sphingolipiden und verschiedenen Membranproteinen. Durch die gezielte Beeinflussung dieser Membrandomänen sollte deren Rolle bei der Ausläuferbildung untersucht werden. Hierfür wurden Caco-2-Zellen unter anderem mit Sphingomyelinase vorbehandelt, diese hydrolysiert Sphingomyelin zu Ceramid und Phosphocholin. Sphingomyelinase ist in der Lage den Sphingomyelingehalt der Plasmamembran zu senken, wenn es zu Zellkulturen hinzugegeben wird (Matsuda *et al.*, 2010). Durch DIC-lebendzellmikroskopische Untersuchungen der Sphingomyelinase-vorbehandelten Zellen wurde ein hemmender Effekt auf die CDT-induzierte Ausläuferbildung beobachtet (Abbildung 25A). Die Quantifizierung der relativen Ausläuferbildung aus diesen Experimenten ist in Abbildung 25B dargestellt. In ADP-Nachribosylierungsexperimenten mit Zelllysaten von Sphingomyelinase-vorbehandelten oder unbehandelten Caco-2-Zellen konnte kein Unterschied in der Aktin-ADP-Ribosylierung nach 2 h CDT-Behandlung detektiert werden (Abbildung 25D). Die Vorbehandlung von Caco-2-Zellen mit Myriocin, einem Inhibitor der Sphingolipidsynthese (Poole *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2014), zeigte den gleichen hemmenden Effekt auf die Ausläuferbildung (Abbildung

25B). Nystatin, ein Cholesterol-bindendes Polyen-Antibiotikum (Bolard, 1986), hemmte die Ausläuferbildung ebenfalls (Abbildung 25B).

Zur Störung des Gefüges der *lipid rafts* nach CDT-Behandlung wurde Benzylalkohol verwendet (Nagy *et al.*, 2007). Erst nach Beginn der Ausläuferbildung wurde Benzylalkohol zu den Caco-2-Zellen hinzugegeben und die Ausläuferbildung weiter aufgenommen (Abbildung 25C). Im Vergleich zur Ausläuferbildung in Kontrollzellen stagnierte sie nach Zugabe des Benzylalkohols, so wie es auch für Methyl- β -Cyclodextrin beobachtet werden konnte (Abbildung 19B). Neben dem Gehalt von Cholesterol in der Plasmamembran ist anscheinend auch die funktionelle Verfügbarkeit von Cholesterol und anderen *lipid raft* Komponenten für die Ausläuferbildung essenziell.

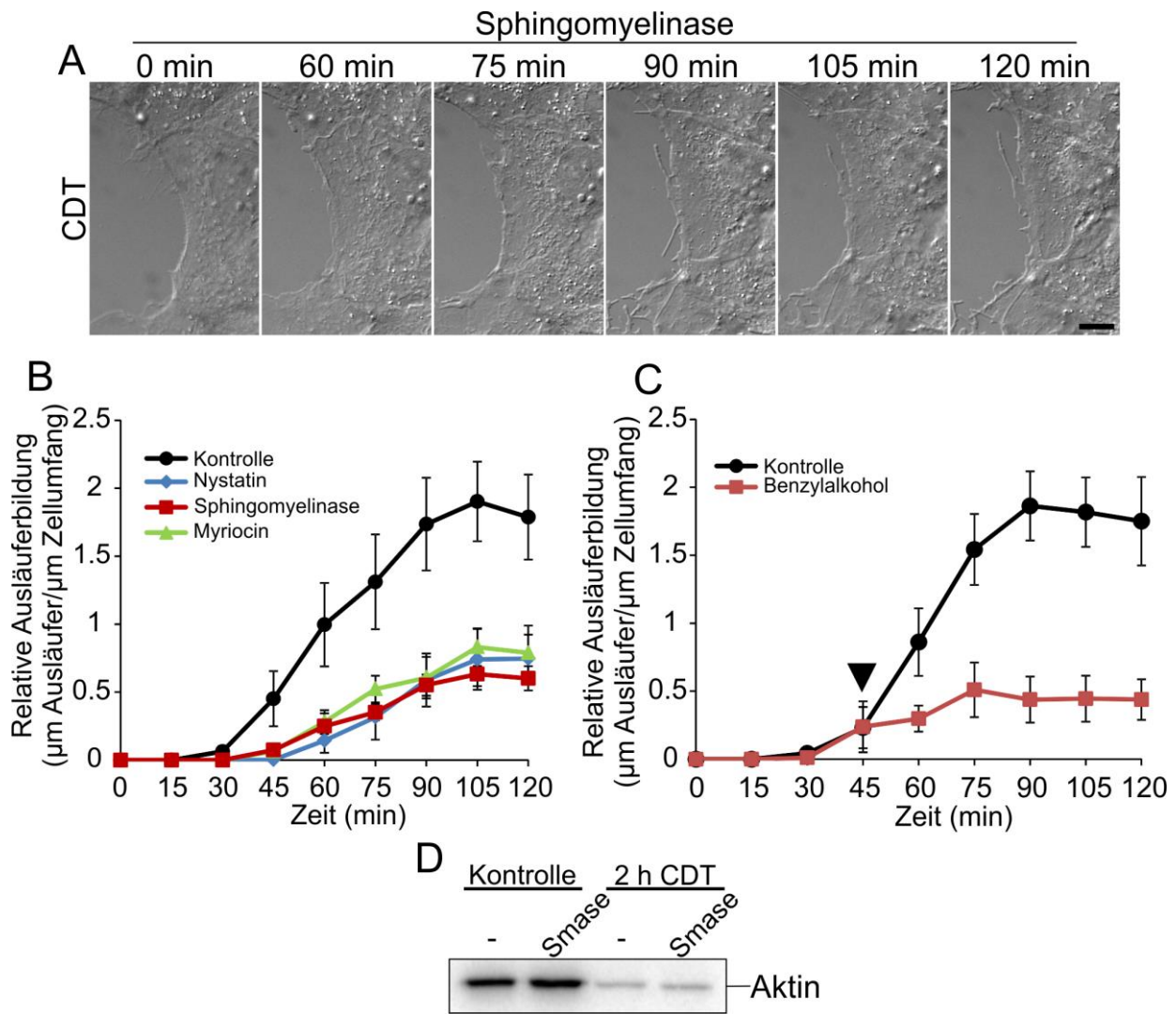


Abbildung 25: Einfluss der Substanzen Nystatin, Myriocin, Benzylalkohol und Sphingomyelinase auf die Bildung CDT-induzierter zellulärer Ausläufer. (A) DIC-lebendzellmikroskopische Untersuchung subkonfluenten Caco-2-Zellen. Die Zellen wurden mit 0,5 U/ml Sphingomyelinase für 1 h vorbehandelt und anschließend mit CDT (200 ng/ml CDTa, 400 ng/ml CDTb) behandelt. Die jeweilige Inkubationszeit ist über den Bildausschnitten angegeben. Der Kalibrationsbalken entspricht 10 μm . (B) Quantifizierung der Ausläuferbildung aus verschiedenen DIC-lebendzellmikroskopischen Experimenten nach CDT-Behandlung (200 ng/ml CDTa, 400 ng/ml CDTb) subkonfluenten Caco-2-Zellen. Dargestellt ist die relative Ausläuferbildung. Hierfür wurde die Länge der Ausläufer alle 15 min addiert und gegen den Zellumfang normalisiert (μm Ausläufer/ μm Zellumfang). Die schwarze Kurve stellt die Ausläuferbildung unter Kontrollbedingungen dar. Die anderen Kurven stellen die Ausläuferbildung von Caco-2-Zellen dar, die mit den unterschiedlichen Substanzen vorbehandelt wurden (grün: 10 μM Myriocin für 48 h; blau: 25 $\mu\text{g/ml}$ Nystatin für 1 h; rot: 0,5 U/ml Sphingomyelinase für 1 h). (C) Quantifizierung der Ausläuferbildung aus DIC-lebendzellmikroskopischen Experimenten mit subkonfluenten Caco-2-Zellen nach CDT-Behandlung (200 ng/ml CDTa, 400 ng/ml CDTb). Die schwarze Kurve stellt die Kontrolle dar. Die rote Kurve zeigt den Effekt von Benzylalkohol auf die Ausläuferbildung. Hierfür wurden die Zellen nach Beginn der Ausläuferbildung mit Benzylalkohol (40 mM) behandelt (Pfeil) und für 75 min weiter aufgenommen. (D) Repräsentatives Autoradiogramm aus ADP-Nachribosylierungsexperimenten, die mit Zelllysaten von Sphingomyelinase-vorbehandelten (Smase) Caco-2-Zellen durchgeführt wurden. Hierfür wurden konfluente Caco-2-Zellen mit Sphingomyelinase vorbehandelt (0,5 U/ml für 1 h) oder blieben unbehandelt (-). Anschließend wurden die Zellen für 2 h mit CDT behandelt und danach lysiert oder blieben unbehandelt (Kontrolle). Unmodifiziertes G-Aktin wurde in den Zelllysaten in Gegenwart von [^{32}P]NAD durch C2I „nachribosyliert“ und die Lysate durch SDS-PAGE aufgetrennt. Das Acrylamidgel wurde im Phosphorimager ausgelesen. Die Fehlerindikatoren in B und C geben den Standardfehler von ≥ 5 Positionen mit ≥ 2 Zellen je Position aus 3 Experimenten an.

4.1.7. Untersuchungen zur Zytotoxizität der verwendeten Substanzen

Für die bisherigen Untersuchungen zum Einfluss der Membrankonstitution auf die CDT-induzierte Ausläuferbildung wurden Caco-2-Zellen mit verschiedenen Substanzen behandelt, die alle auf die Zerstörung von *lipid rafts* abzielten. Weitere Untersuchungen zur Wirkung dieser Substanzen sollten zeigen, ob die Hemmung der Ausläuferbildung durch eine zytotoxische Wirkung der Substanzen auf Caco-2-Zellen hervorgerufen oder mitbeeinflusst wurde. Hierfür wurde der Einfluss der Substanzen auf die Zellmorphologie videomikroskopisch untersucht (Abbildung 26A). Keine der Substanzen führte durch die hier verwendete Konzentration oder Behandlungsdauer zu morphologischen Veränderungen der untersuchten Caco-2-Zellen. Durch die Verwendung eines Mikrotiterplatten-basierten Zellviabilitätstests wurden die verschiedenen Substanzen auf ihre Zytotoxizität getestet (Abbildung 26B). In diesen Untersuchungen zeigte sich keine Beeinflussung der Viabilität der Zellen durch die üblich verwendeten Konzentrationen der verschiedenen Substanzen.

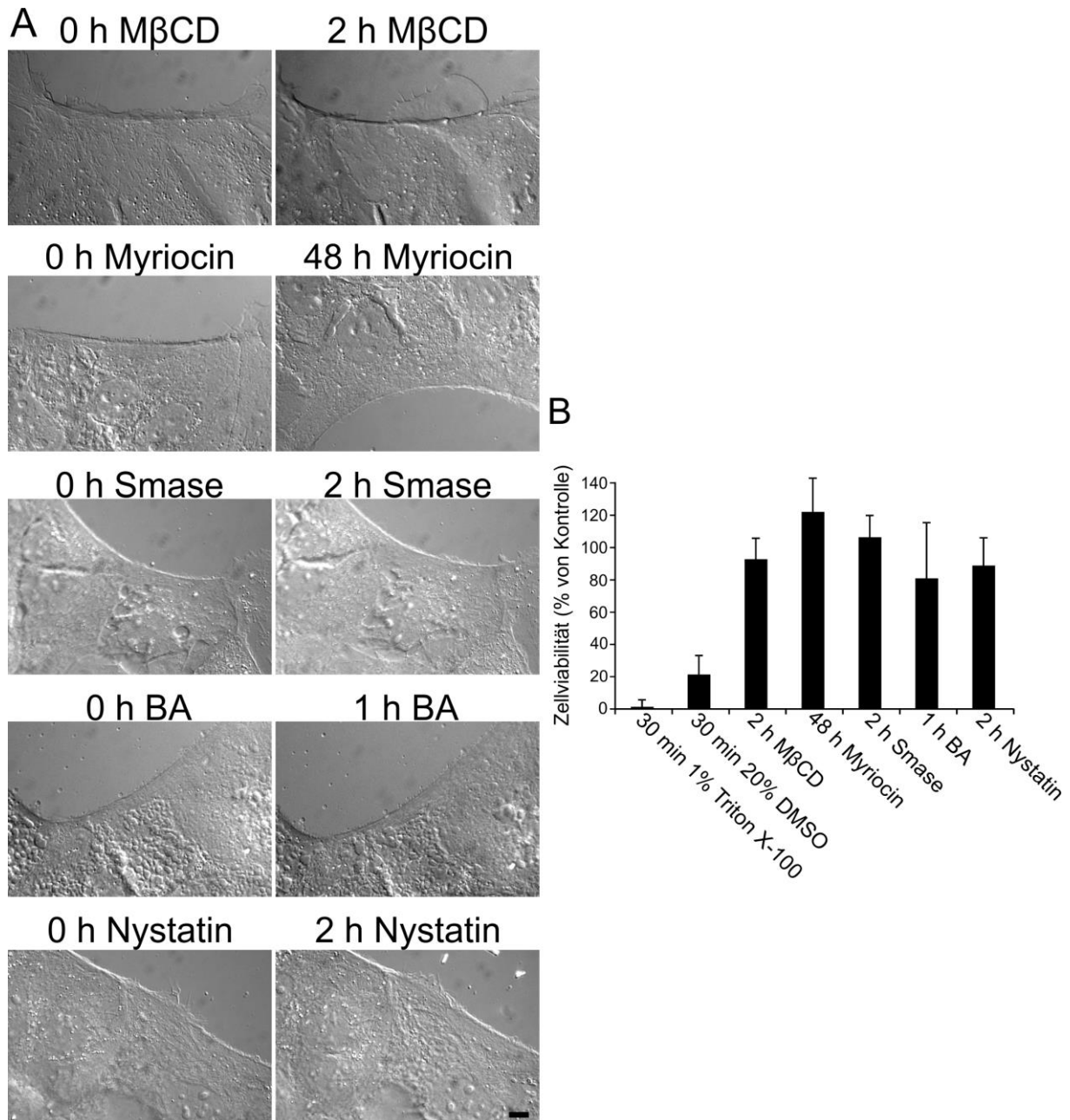


Abbildung 26: Untersuchungen zum Einfluss der verwendeten Substanzen auf die Zellviabilität von Caco-2-Zellen. (A) DIC-lebendzellmikroskopische Untersuchung zum Einfluss der verwendeten Substanzen auf die Zellmorphologie. Subkonfluente Caco-2-Zellen wurden nach unterschiedlichen Behandlungen für die angegebenen Zeiträume aufgenommen und Effekte auf die Morphologie untersucht (Behandlungen: 2 h mit 5 mM Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD); 48 h mit 10 μ M Myriocin; 0,5 U/ml Sphingomyelinase (Smase) für 2 h; 1 h mit 40 mM Benzylalkohol (BA); 2 h mit 25 μ g/ml Nystatin). Dargestellt sind Bildausschnitte zu Beginn der Experimente und nach der angegebenen Behandlungsdauer. Bei den mit Myriocin behandelten Zellen handelt es sich um zwei unterschiedliche Bildausschnitte, da sich die Videomikroskopie über 48 h nicht aufrecht erhalten ließ. Der Kalibrationsbalken entspricht 10 μ m. (B) Darstellung der Effekte der unter A beschriebenen Behandlungen auf die Zellviabilität, gemessen mit dem *CellTiter-Blue Cell Viability Assay*. Als Positivkontrolle wurden die Zellen für 30 min mit 1 % (V/V) Triton X-100 oder 20 % (V/V) DMSO inkubiert. Dargestellt ist die Zellviabilität als % der Kontrolle. Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung von je 4 Messungen an.

4.1.8. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur Lokalisation von *lipid raft*-Markern

Bestimmte Glykosphingolipide wie das Gangliosid GM1 reichern sich in *lipid rafts* an (Bucciantini *et al.*, 2012). Auch das Protein Flotillin 2 reichert sich durch seinen palmitoylierten Amino-Terminus in den Membrandomänen an (Rhee *et al.*, 2013). Hier wurden fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur Lokalisation dieser *lipid raft*-Marker in Caco-2-Zellen durchgeführt. Zur Visualisierung des Gangliosids GM1 wurde mit Fluoresceinisothiocyanat markierte Cholera-Toxin-B-Untereinheit verwendet, die dieses spezifisch bindet (Margheri *et al.*, 2014) (Abbildung 27). In unbehandelten Zellen zeigte sich eine homogene Verteilung von GM1. In CDT-behandelten Zellen war zu beobachten, dass die GM1-Fluoreszenz in Bereichen der Ausläuferbildung angereichert war. Besonders deutlich war dies an den Spitzen der Ausläufer. In Zellen, die mit Methyl- β -Cyclodextrin vorbehandelt wurden, war ebenfalls eine Anreicherung der GM1-Fluoreszenz an den gebildeten Zellausläufern zu beobachten, auch wenn die Ausläuferbildung deutlich reduziert war. Abbildung 28 zeigt Bildausschnitte fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen, die zur Lokalisation des *lipid raft*-Markers Flotillin 2 in Caco-2-Zellen durchgeführt wurden. Die Zellen wurden mit CDT behandelt oder unbehandelt belassen. In CDT-behandelten Zellen war eine Anreicherung der Flotillin 2-Fluoreszenz entlang des Schafts CDT-induzierter Ausläufer zu beobachten. In Kontrollzellen war diese homogen verteilt. In Methyl- β -Cyclodextrin-vorbehandelten Zellen war dieser Effekt der CDT-Behandlung auf die Flotillin 2-Lokalisation ebenfalls zu beobachten, auch wenn die Ausläuferbildung deutlich reduziert war. Die Anreicherung der *lipid raft*-Marker an Stellen der CDT-induzierten Ausläuferbildung unterstützt die vorherigen Befunde zum Einfluss dieser Membrandomänen auf diesen Prozess.

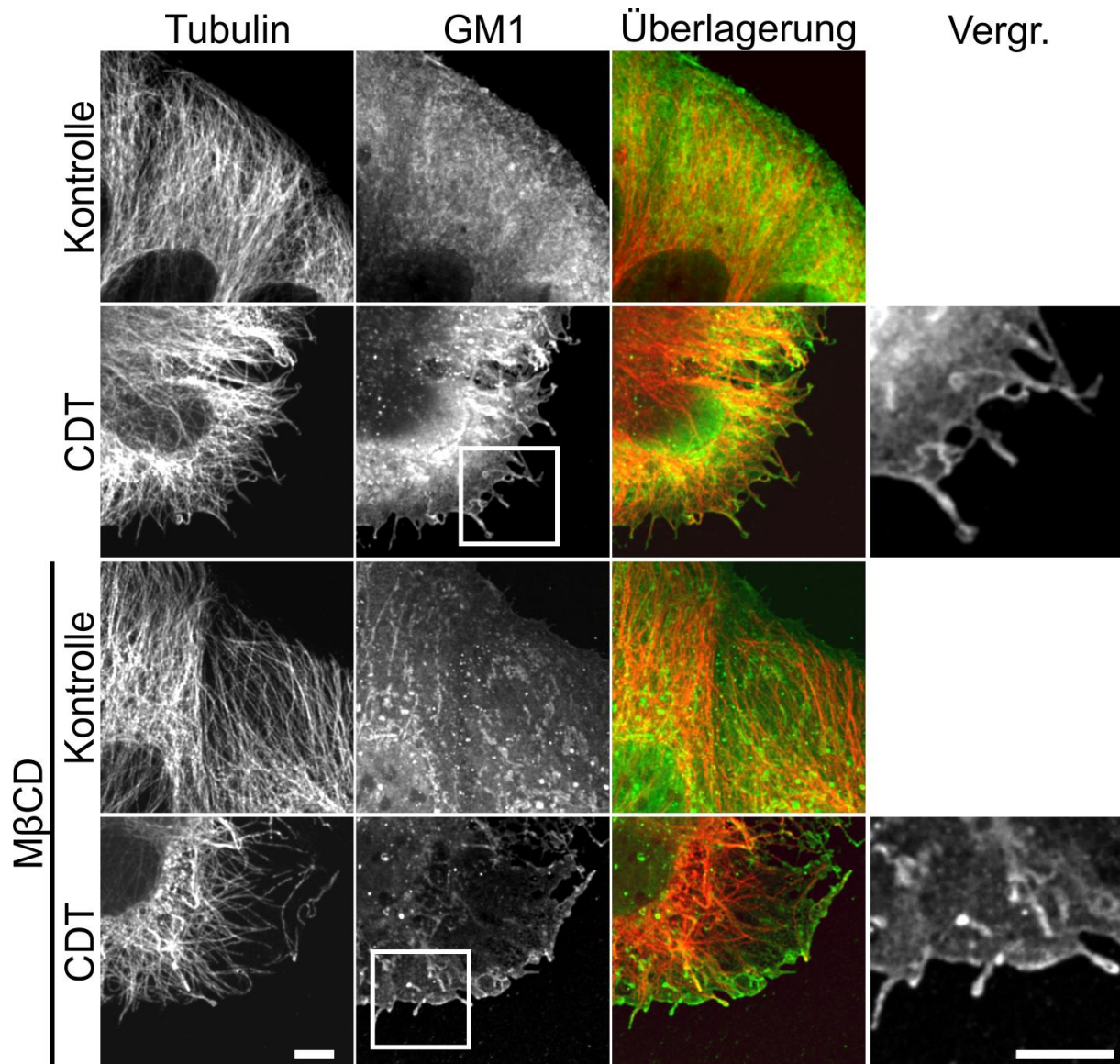


Abbildung 27: Einfluss von CDT auf die Lokalisation des Gangliosids GM1. Konfokale fluoreszenzmikroskopische Untersuchung subkonfluenter Caco-2-Zellen. Dargestellt ist das Mikrotubulizytoskelett durch indirekte Immunfluoreszenz sowie durch Cholera-Toxin-B-Untereinheit-Fluoresceinisothiocyanat markiertes Gangliosid GM1. Die Zellen wurden für 90 min mit CDT behandelt (200 ng/ml CDTa, 400 ng/ml CDTb) oder unbehandelt belassen (Kontrolle). Zusätzlich wurden die Zellen mit Methyl-β-Cyclodextrin (MβCD) vorbehandelt (5 mM für 30 min) oder unbehandelt belassen. Die vergrößerten Bildausschnitte zeigen die Fluoreszenz des Cholera-Toxin-B-Untereinheit-Fluoresceinisothiocyanats. Die Kalibrationsbalken entsprechen 5 μm.

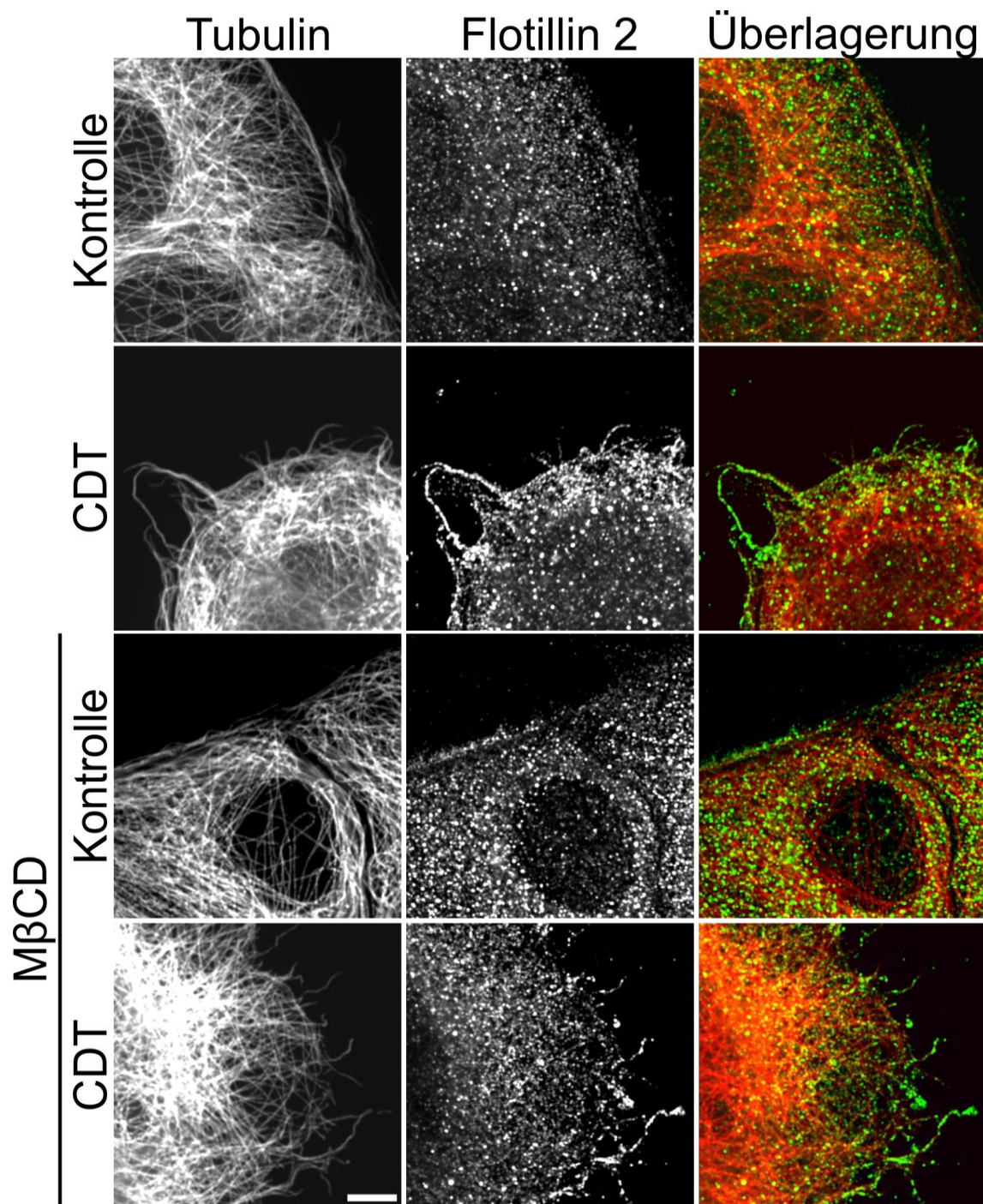


Abbildung 28: Einfluss von CDT auf die Lokalisation von Flotillin 2. Konfokale fluoreszenzmikroskopische Untersuchung subkonfluenter Caco-2-Zellen. Dargestellt sind das Mikrotubulizytoskelett und Flotillin 2 durch indirekte Immunfluoreszenz. Die Zellen wurden für 90 min mit CDT behandelt (200 ng/ml CDTa, 400 ng/ml CDTb) oder unbehandelt belassen (Kontrolle). Zusätzlich wurden die Zellen mit Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD) vorbehandelt (5 mM für 30 min) oder unbehandelt belassen. Der Kalibrationsbalken entspricht 5 μ m.

4.2. Untersuchungen zur Beteiligung des Septinzytoskeletts an der CDT-induzierten Ausläuferbildung

4.2.1. Der Einfluss von CDT auf die Organisation des Septinzytoskeletts

In dem folgenden Ergebnisteil wurde die Wirkung von CDT auf das Septinzytoskelett und dessen Rolle bei der Bildung CDT-induzierter Ausläufer näher untersucht. Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von Caco-2-Zellen zeigten einen deutlichen Effekt der CDT-Behandlung auf die Organisation des Septinzytoskeletts. In unbehandelten Caco-2-Zellen zeigte das Septinzytoskelett eine filamentöse Struktur, wobei sich die Septinfilamente meist entlang des Mikrotubuli- und Aktinzytoskeletts orientierten, mit deren Filamenten sie größtenteils colokalisierten. Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass sich die Septine 2, 6 und 7 an der Bildung dieser Filamente in Caco-2-Zellen beteiligten (Abbildung 30, Abbildung 31 und Abbildung 32). In CDT-behandelten Caco-2-Zellen zeigte sich eine andere Morphologie des Septinzytoskeletts. Hier bildeten die Septine deutlich kürzere und gebogene Filamente. Besonders auffällig waren Septinringe und Halbkreise, die nach der CDT-Behandlung zu beobachten waren, sowie trichterförmige Septinstrukturen am zellulären Kortex. Abbildung 29 zeigt diesen Einfluss von CDT auf das Septinzytoskelett in Caco-2-Zellen.

4.2.2. Die Lokalisation von Septinfilamenten an der Basis CDT-induzierter Ausläufer

Wie oben dargestellt wurde, führte CDT zu einer Umorganisation des Septinzytoskeletts, die durch die Bildung trichterförmiger Septinstrukturen am Zellkortex charakterisiert war. In immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen war nun zu beobachten, dass sich diese trichterförmigen Septinstrukturen offenbar an der Basis der CDT-induzierten Zellausläufer befanden. Weitere Untersuchungen zeigten die Beteiligung der Septine 2, 6 und 7 an der Bildung dieser Septinstrukturen in Caco-2-Zellen (Abbildung 30, Abbildung 31 und Abbildung 32). Als nächstes wurden 3D-Rekonstruktionen der Septinstrukturen an der Ausläuferbasis aus einzelnen konfokalen Schnittaufnahmen angefertigt. Hierfür wurden die Ausläufer apikal auf CDT-behandelten Caco-2-Zellen, deren Mikrotubuli- und Septinzytoskelett immunzytochemisch angefärbt worden waren, konfokal-fluoreszenzmikroskopisch aufgenommen und mithilfe der Mikroskop-Software 3D-Rekonstruktionen angefertigt. Hierbei konnte beobachtet werden, dass die trichterförmigen Septinstrukturen die Ausläuferbasis manschettenartig umgeben (Abbildung 33A).

Videomikroskopische Untersuchungen der Mikrotubulipolymerisation und der Septinfilamente an der Ausläuferbasis in CDT-behandelten Caco-2-Zellen, die mit Septin 6-tomato und EB3-GFP cotransfiziert worden waren, zeigten, dass die Septinstrukturen hohl waren und die Mikrotubuli durch sie hindurch in die Ausläufer hinein polymerisieren konnten (Abbildung 33B). In videomikroskopischen Untersuchungen konnte auch beobachtet werden, dass die Septinstrukturen an der Ausläuferbasis fest mit der Ausläuferbasis verbunden blieben. Hierfür wurden Caco-2-Zellen mit Tubulin-RFP und Septin 7-GFP cotransfiziert und die Septinakkumulationen an der Ausläuferbasis über mehrere Minuten beobachtet (Abbildung 33C). In den anderen kolorektalen Karzinomzelllinien, die hier untersucht wurden (T84- und HCT116-Zellen), zeigte sich ebenfalls die CDT-induzierte Umorganisation des Septinzytoskeletts und die spezifische Lokalisation von Septinstrukturen an der Basis CDT-induzierter Ausläufer (Abbildung 34). Mit den durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass neben Mikrotubuli ebenfalls Septinfilamente die zytoskelettale Basis CDT-induzierter Ausläufer formten. Sie bildeten trichterförmige Manschetten an der Basis der Ausläufer, die stabil mit den Ausläufern assoziiert blieben.

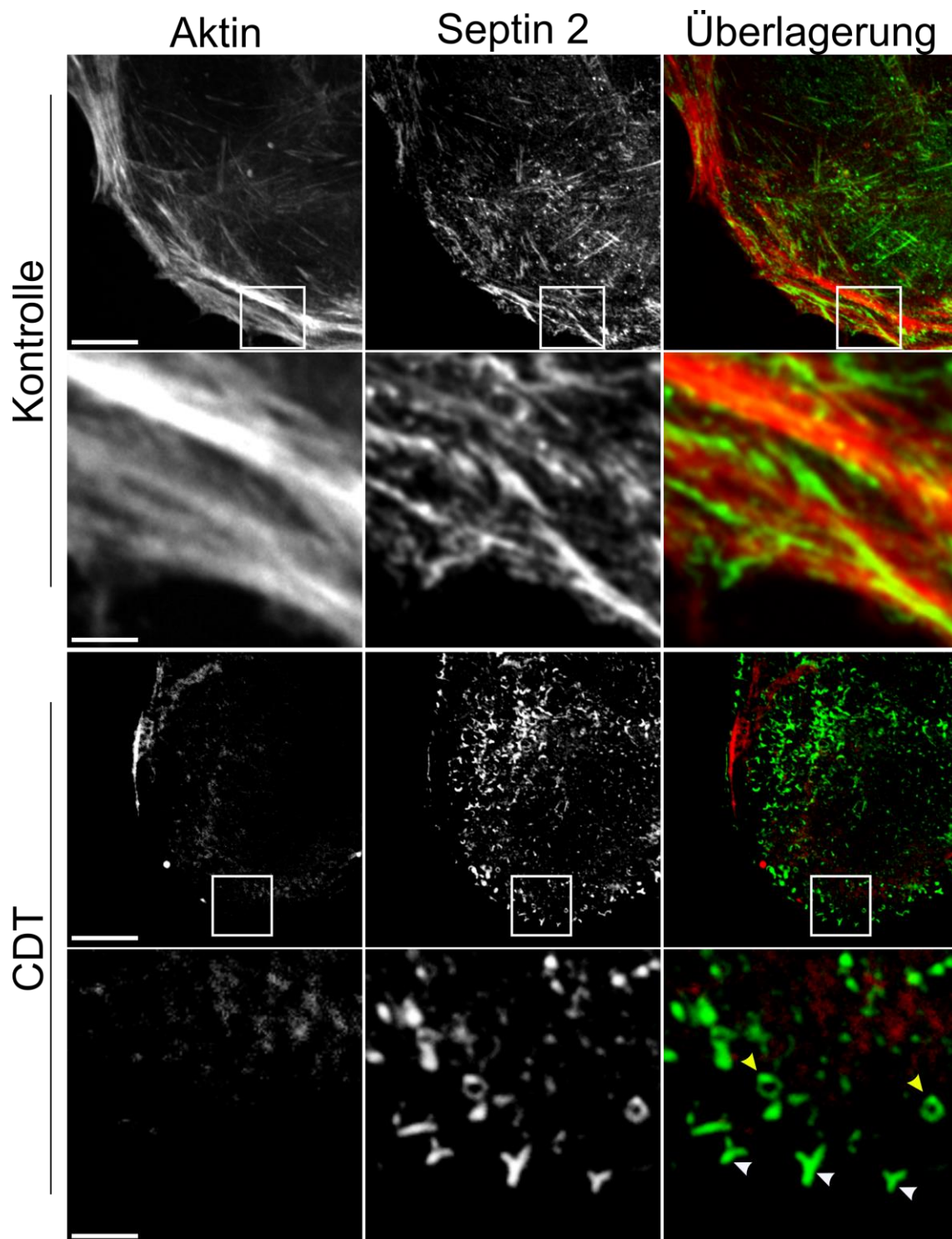


Abbildung 29: Einfluss von CDT auf die Organisation des Septinzytoskeletts. Konfokale fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von subkonfluenten Caco-2-Zellen. Immunzytochemisch dargestellt ist Septin 2. Das Aktinzytoskelett wurde durch Phalloidin-Tetramethylrhodamin fluorescent markiert. Die Caco-2-Zellen wurden für 90 min mit CDT behandelt (200 ng/ml CDTa, 400 ng/ml CDTb) oder blieben unbehandelt (Kontrolle). Dargestellt sind repräsentative Bildausschnitte aus diesen Experimenten. Die vergrößerten Ausschnitte zeigen jeweils den Bereich des Zellkortex. Die gelben Pfeile zeigen auf entstandene Septinringe, die weißen Pfeile zeigen auf die entstandenen trichterförmigen Septinstrukturen am zellulären Kortex. Die Kalibrationsbalken entsprechen 10 μm und 2 μm in den vergrößerten Bildausschnitten.

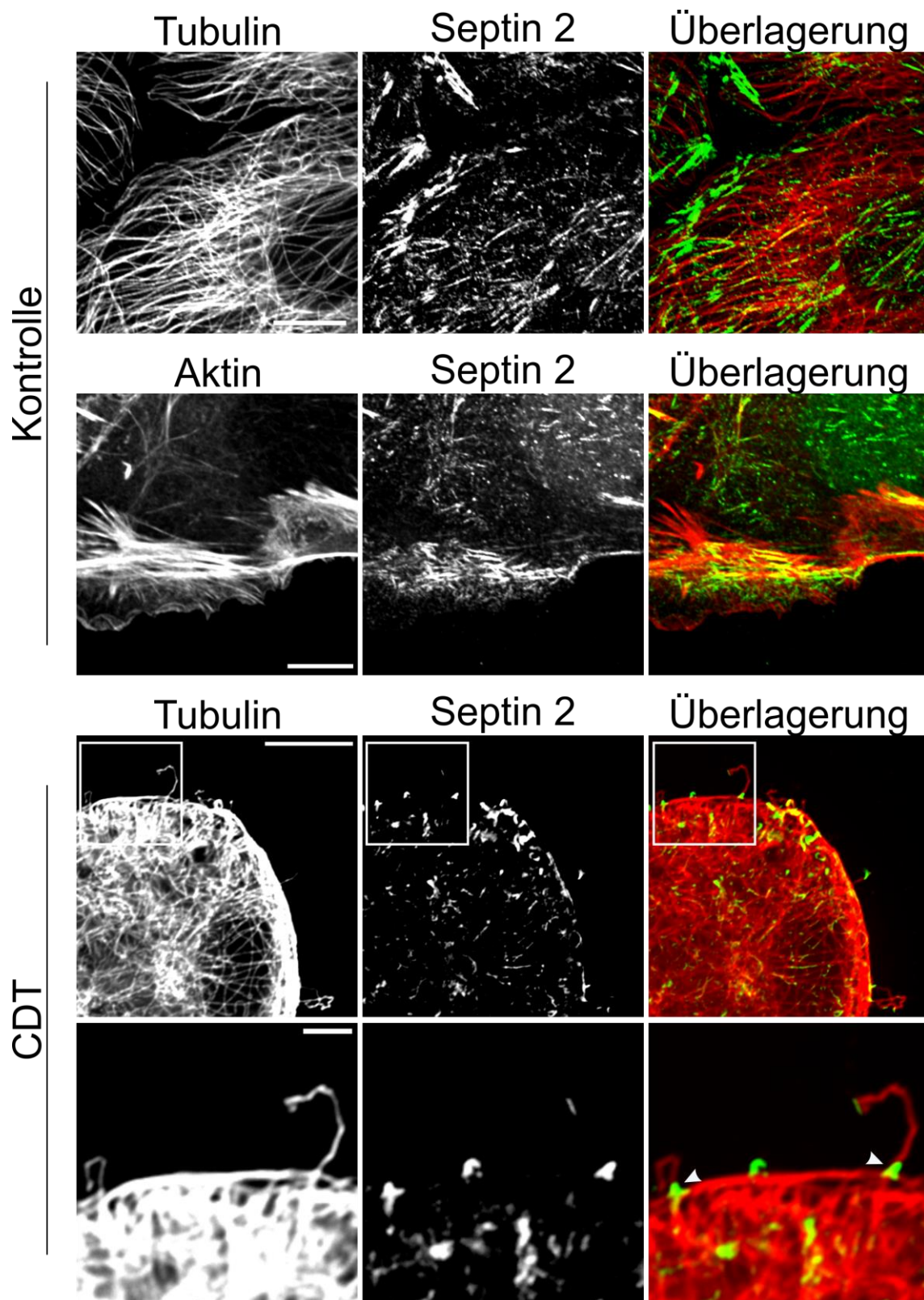


Abbildung 30: Lokalisation von Septin 2 in Caco-2-Zellen und an der Basis CDT-induzierter Zellausläufer. Konfokale fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen subkonfluenter Caco-2-Zellen. Immunzytochemisch dargestellt sind Septin 2 und das Mikrotubulizytoskelett. Das Aktinzytoskelett wurde durch Phalloidin-Tetramethylrhodamin fluorescent markiert. Die Caco-2-Zellen wurden für 90 min mit CDT behandelt (200 ng/ml CDTa, 400 ng/ml CDTb) oder blieben unbehandelt (Kontrolle). Dargestellt sind repräsentative Bildausschnitte der durchgeführten Experimente. Die vergrößerten Ausschnitte zeigen den Bereich des Zellkortex, die weißen Pfeile zeigen auf die trichterförmigen Septinstrukturen an der Basis CDT-induzierter Zellausläufer. Die Kalibrationsbalken entsprechen 10 μm und 2 μm in den vergrößerten Bildausschnitten.

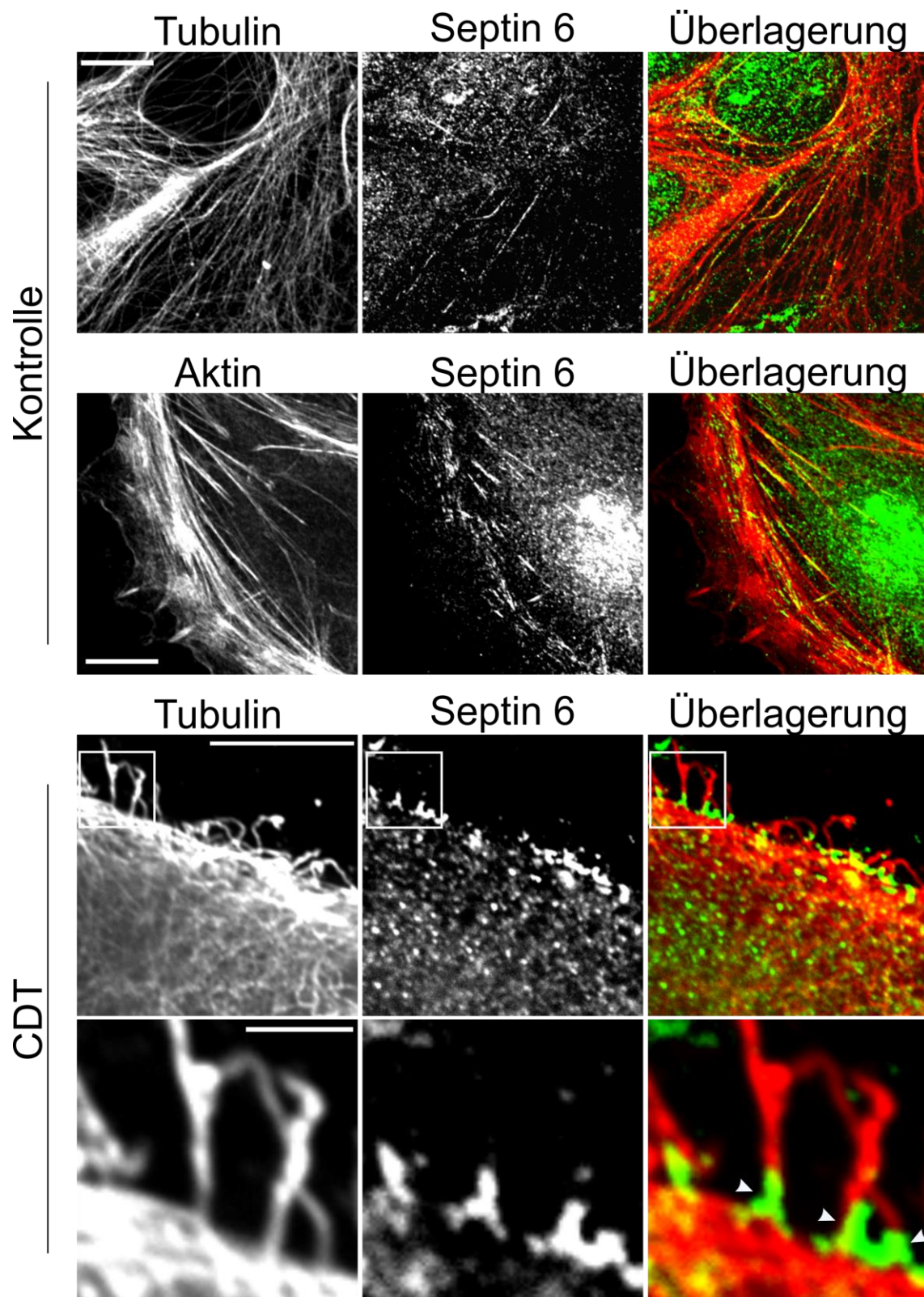


Abbildung 31: Lokalisation von Septin 6 in Caco-2-Zellen und an der Basis CDT-induzierter Zellausläufer. Konfokale fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen subkonfluenter Caco-2-Zellen. Immunzytochemisch dargestellt sind Septin 6 und das Mikrotubulizytoskelett. Das Aktinzytoskelett wurde durch Phalloidin-Tetramethylrhodamin fluoreszent markiert. Die Caco-2-Zellen wurden für 90 min mit CDT behandelt (200 ng/ml CDTa, 400 ng/ml CDTb) oder blieben unbehandelt (Kontrolle). Dargestellt sind repräsentative Bildausschnitte der durchgeführten Experimente. Die vergrößerten Ausschnitte zeigen den Bereich des Zellkortex, die weißen Pfeile zeigen auf die trichterförmigen Septinstrukturen an der Basis CDT-induzierter Zellausläufer. Die Kalibrationsbalken entsprechen 10 μm und 2 μm in den vergrößerten Bildausschnitten.

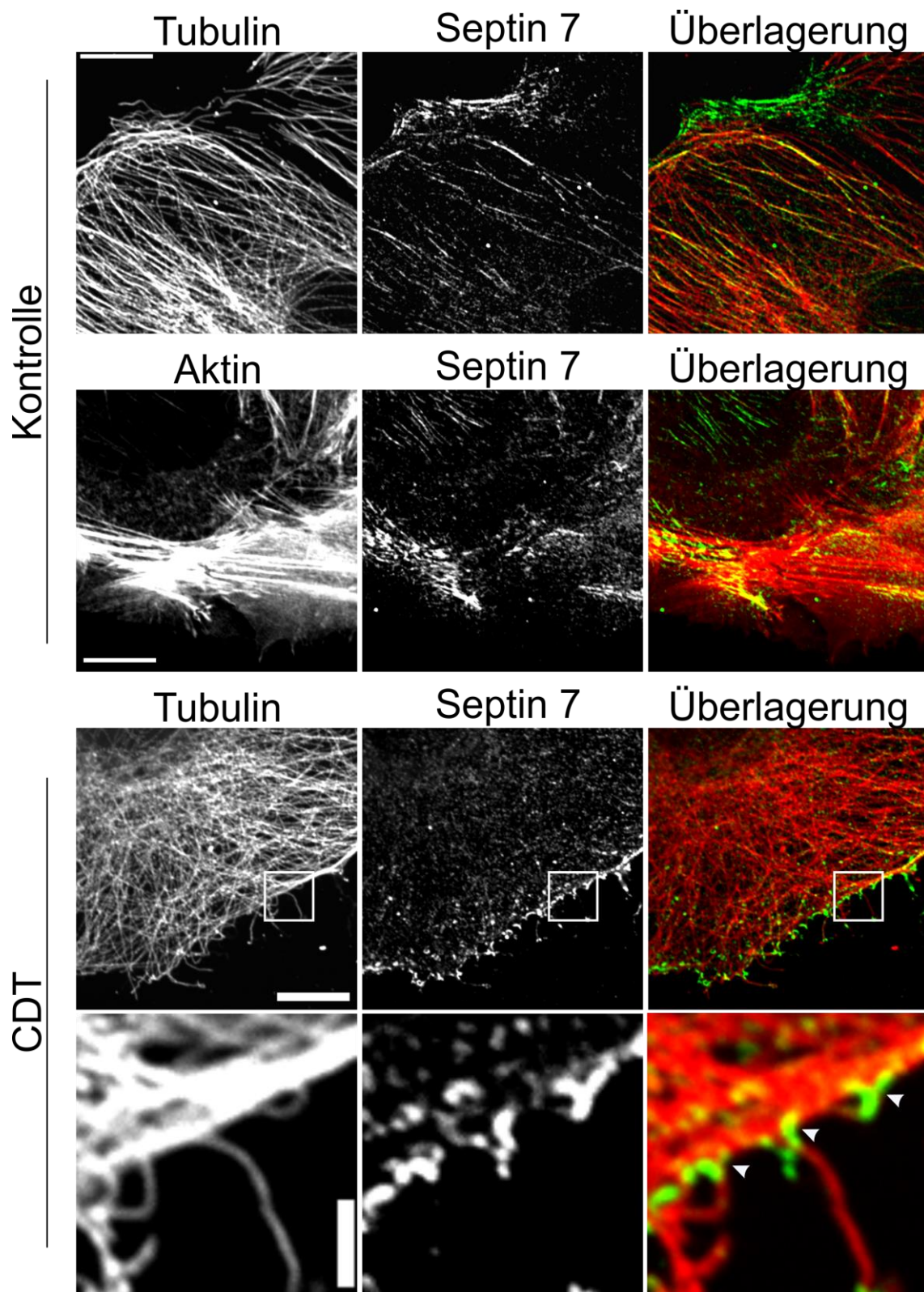


Abbildung 32: Lokalisation von Septin 7 in Caco-2-Zellen und an der Basis CDT-induzierter Zellausläufer. Konfokale fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen subkonfluenter Caco-2-Zellen. Immunzytochemisch dargestellt sind Septin 7 und das Mikrotubulizytoskelett. Das Aktinzytoskelett wurde durch Phalloidin-Tetramethylrhodamin fluoreszent markiert. Die Caco-2-Zellen wurden für 90 min mit CDT behandelt (200 ng/ml CDTa, 400 ng/ml CDTb) oder blieben unbehandelt (Kontrolle). Dargestellt sind repräsentative Bildausschnitte der durchgeführten Experimente. Die vergrößerten Ausschnitte zeigen den Bereich des Zellkortex, die weißen Pfeile zeigen auf die trichterförmigen Septinstrukturen an der Basis CDT-induzierter Zellausläufer. Die Kalibrationsbalken entsprechen 10 μm und 2 μm in den vergrößerten Bildausschnitten.

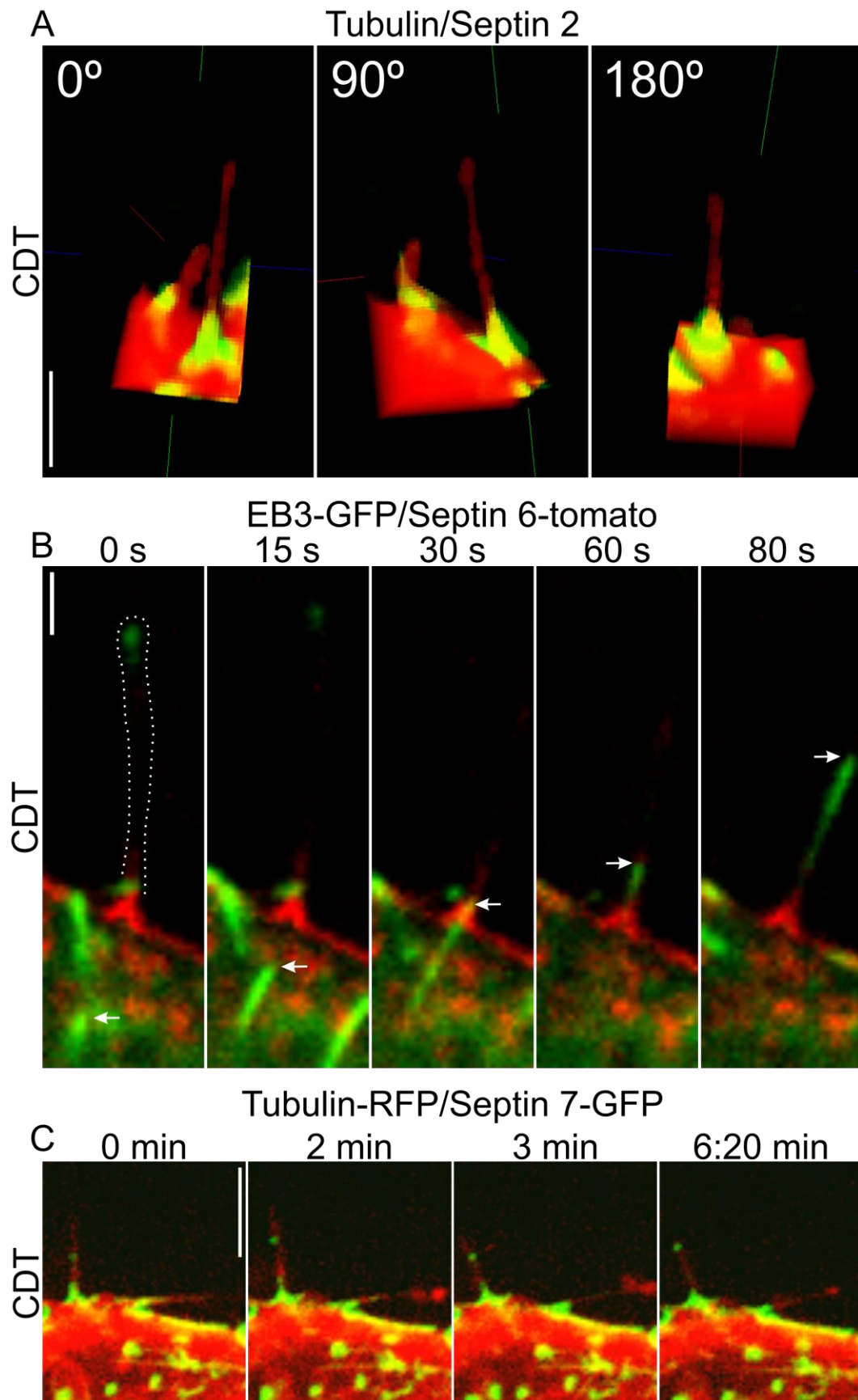


Abbildung 33: Lokalisation, Struktur und Dynamik der Septinfilamente an der Basis CDT-induzierter Ausläufer in Caco-2-Zellen. (A) 3D-Rekonstruktion konfokaler fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen CDT-induzierter Zellausläufer in subkonfluenten Caco-2-Zellen. Die Caco-2-Zellen wurden in Glasbodenschalen kultiviert und für 90 min mit CDT behandelt (200 ng/ml CDTa, 400 ng/ml CDTb). Sie wurden wie in den Abschnitten 3.2.3.4.1 und 3.2.3.4.2 beschrieben

fixiert und immunzytochemisch behandelt. Die Zellen wurden jedoch nicht eingedeckt sondern in PBS überführt, um die apikalen CDT-induzierten Ausläufer darzustellen. Dargestellt sind drei verschiedene Drehwinkel (0° , 90° , 180°) einer repräsentativen 3D-Rekonstruktion eines CDT-induzierten Zellausläufers. Immunzytochemisch sind Septin 2 (grün) und Tubulin (rot) dargestellt. Der Kalibrationsbalken entspricht $2\ \mu\text{m}$. **(B)** Konfokale fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Mikrotubulipolymerisation (grün) und der Septinfilamente (rot) lebender subkonfluenter Caco-2-Zellen an der Basis CDT-induzierter Zellausläufer. Die Caco-2-Zellen wurden für 24 h mit EB3-GFP und Septin 6-tomato cotransfiziert, mit CDT behandelt ($200\ \text{ng/ml}$ CDTa, $400\ \text{ng/ml}$ CDTb) und nach 90 min die Fluoreszenz CDT-induzierter Ausläufer videomikroskopisch aufgenommen. (*Framerate*: 5 s). Über den entsprechenden Bildausschnitten ist die jeweilige Zeit nach Beginn der Aufnahme angegeben. Im Bildausschnitt 0 s gibt die gestrichelte Linie die Begrenzung des beobachteten Zellausläufers an. Die Pfeile verfolgen die Spitze eines in den Zellausläufer polymerisierenden Mikrotubulus. Der Kalibrationsbalken entspricht $2\ \mu\text{m}$. **(C)** Konfokale fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen lebender subkonfluenter Caco-2-Zellen. Dargestellt sind Mikrotubuli (rot) und Septinfilamente (grün), hierfür wurden die Zellen für 24 h mit Tubulin-RFP und Septin 7-GFP cotransfiziert und mit CDT behandelt ($200\ \text{ng/ml}$ CDTa, $400\ \text{ng/ml}$ CDTb). Nach 90 min CDT-Behandlung wurde die Fluoreszenz entstandener CDT-induzierter Zellausläufer videomikroskopisch aufgenommen (*Framerate*: 10 s). Dargestellt ist die Basis CDT-induzierter Ausläufer über den Beobachtungszeitraum von 6:20 min und die dort befindlichen Septinfilamente. Gezeigt werden repräsentative Bildausschnitte dieser Experimente. Über den entsprechenden Bildausschnitten ist die jeweilige Beobachtungsdauer nach Beginn der Aufnahme angegeben. Der Kalibrationsbalken entspricht $5\ \mu\text{m}$.

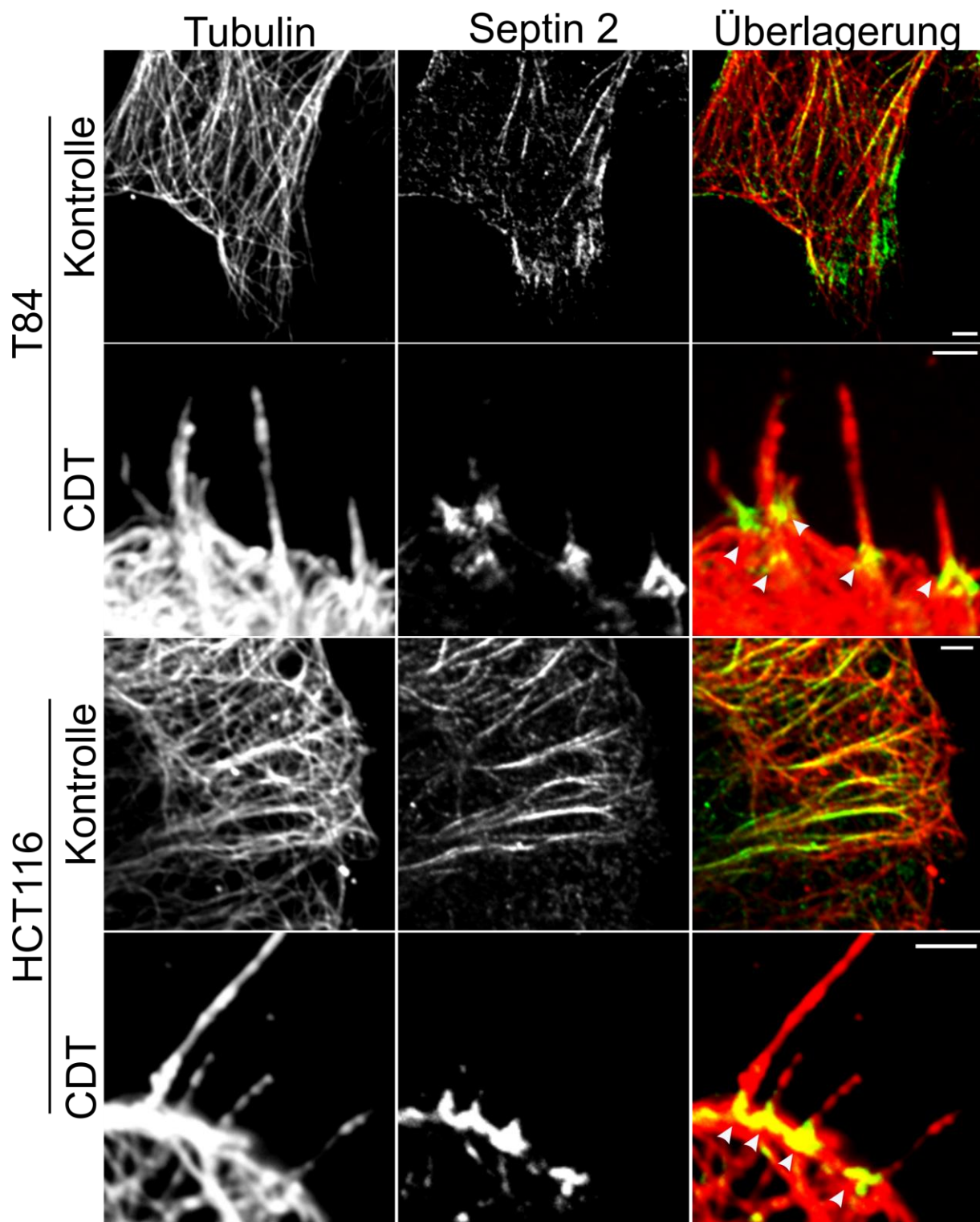


Abbildung 34: Lokalisation von Septin 2 an der Basis CDT-induzierter Zellausläufer in T84- und HCT116-Zellen. Konfokale fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen subkonfluenter Zellen. Immunzytochemisch dargestellt sind Septin 2 und das Mikrotubulizytoskelett. Die Zellen wurden für 90 min mit CDT behandelt (20 ng/ml CDTa, 40 ng/ml CDTb) oder blieben unbehandelt (Kontrolle). Dargestellt sind repräsentative Bildausschnitte der Lokalisation von Septinfilamenten in Kontrollzellen und der Septinfilamente an der Basis CDT-induzierter Ausläufer in den verwendeten Zelllinien. Die weißen Pfeile zeigen auf die Septinstrukturen an der Ausläuferbasis. Die Kalibrationsbalken entsprechen 2 μ m.

4.2.3. Die Lokalisation von Septinen bei der Ausläuferbildung

Um die Septindynamik bei der Ausläuferbildung zu beobachten, wurden die verschiedenen Septine 2, 6 und 7 von humaner cDNA in den pEGFP-N1-Expressionsvektor kloniert und in Caco-2-Zellen transfiziert. Nach der Behandlung mit CDT wurden die Caco-2-Zellen videomikroskopisch untersucht, hierbei wurde neben der GFP-Fluoreszenz auch die DIC-durchlichtmikroskopischen Informationen der Zellen aufgezeichnet. Zur Analyse wurden diese übereinander gelegt (Abbildung 35, Abbildung 36 und Abbildung 37). Es zeigte sich, dass die CDT-induzierte Ausläuferbildung an den Stellen der Plasmamembran stattfand, an denen es vorher zur Akkumulation von Septinen gekommen war. Dieses konnte separat für die drei Septine 2, 6 und 7 beobachtet werden, welche sich auch an der Bildung der endogenen Septinstrukturen an der Ausläuferbasis in Caco-2-Zellen beteiligen. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen lebender Caco-2-Zellen, die zuvor mit Septin 6-tomato und Tubulin-GFP Plasmid-DNA cotransfiziert worden waren, zeigten nach CDT-Behandlung, dass Mikrotubuli an Stellen von Septin-Akkumulationen über den Zellrand hinaus wuchsen (Abbildung 38). Septinfilamente fanden sich also nicht nur an der Basis bestehender CDT-induzierter Ausläufer. Sie waren auch an den Stellen der Plasmamembran vorzufinden, wo die CDT-induzierte Ausläuferbildung stattfand.

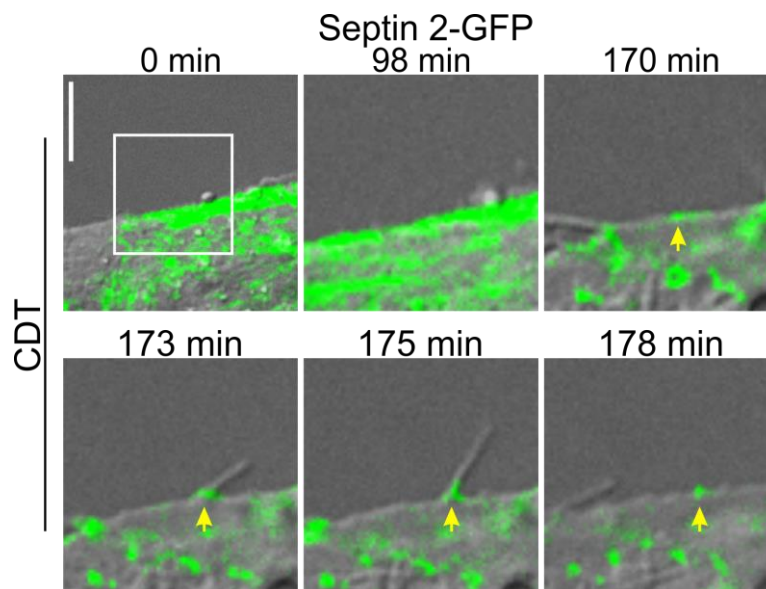


Abbildung 35: CDT-induzierte Zellausläufer bilden sich an Stellen von Septin 2-Akkumulationen an der Plasmamembran. Dargestellt sind Bildausschnitte aus videomikroskopischen Untersuchungen subkonfluenter Caco-2-Zellen, die für 48 h mit Septin 2-GFP transfiziert wurden. Die Caco-2-Zellen wurden mit CDT behandelt (200 ng/ml CDTa, 400 ng/ml CDTb) und anschließend mikroskopisch untersucht (*Framerate*: 1 min). Über den einzelnen Bildausschnitten ist die Zeit nach der CDT-Behandlung angegeben. Dargestellt ist die Überlagerung von DIC-Aufnahmen (Graustufen) und den konfokalen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (grün) repräsentativer Bildausschnitte. Zum Zeitpunkt 0 min ist der Bildausschnitt markiert, der fortlaufend gezeigt ist. Der gelbe Pfeil zeigt die Stelle der Septinakkumulation, an der sich der beobachtete Ausläufer formiert. Der Kalibrationsbalken entspricht 10 μ m.

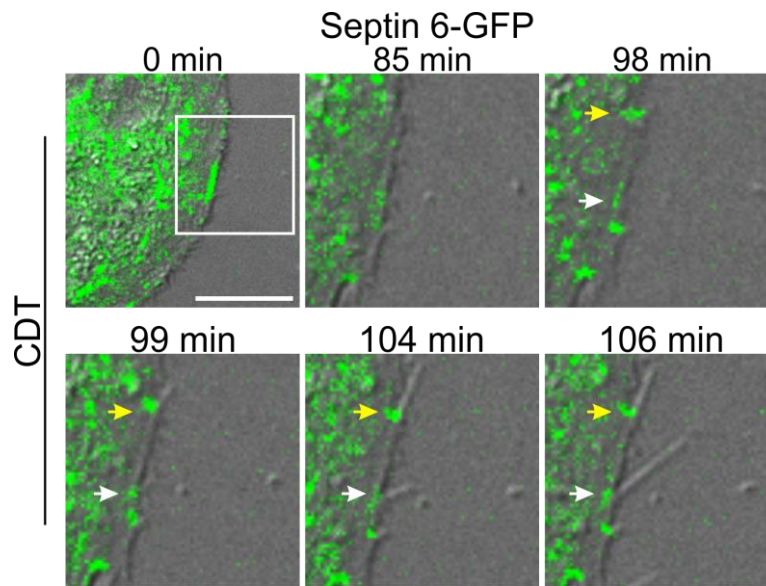


Abbildung 36: CDT-induzierte Zellausläufer bilden sich an Stellen von Septin 6-Akkumulationen an der Plasmamembran. Dargestellt sind Bildausschnitte aus videomikroskopischen Untersuchungen subkonfluenter Caco-2-Zellen, die für 48 h mit Septin 6-GFP transfiziert wurden. Die Caco-2-Zellen wurden mit CDT behandelt (200 ng/ml CDTa, 400 ng/ml CDTb) und anschließend mikroskopisch untersucht (*Framerate*: 1 min). Über den einzelnen Bildausschnitten ist die Zeit nach der CDT-Behandlung angegeben. Dargestellt ist die Überlagerung von DIC-Aufnahmen (Graustufen) und den konfokalen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (grün) repräsentativer Bildausschnitte. Zum Zeitpunkt 0 min ist der Bildausschnitt markiert, der fortlaufend gezeigt ist. Der gelbe und der weiße Pfeil zeigen Stellen von Septinakkumulationen, an denen sich die beobachteten Ausläufer formieren. Der Kalibrationsbalken entspricht 10 µm.

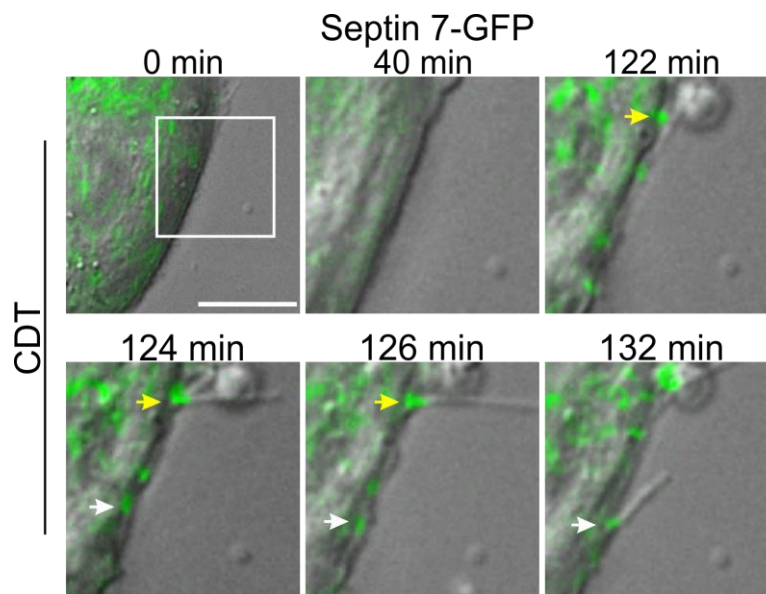


Abbildung 37: CDT-induzierte Zellausläufer bilden sich an Stellen von Septin 7-Akkumulationen an der Plasmamembran. Dargestellt sind Bildausschnitte aus videomikroskopischen Untersuchungen subkonfluenter Caco-2-Zellen, die für 48 h mit Septin 7-GFP transfiziert wurden. Die Caco-2-Zellen wurden mit CDT behandelt (200 ng/ml CDTa, 400 ng/ml CDTb) und anschließend mikroskopisch untersucht (*Framerate*: 1 min). Über den einzelnen Bildausschnitten ist die Zeit nach der CDT-Behandlung angegeben. Dargestellt ist die Überlagerung von DIC-Aufnahmen (Graustufen) und den konfokalen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (grün) repräsentativer Bildausschnitte. Zum Zeitpunkt 0 min ist der Bildausschnitt markiert, der fortlaufend gezeigt ist. Der gelbe und der weiße Pfeil zeigen Stellen von Septinakkumulationen, an denen sich die beobachteten Ausläufer formieren. Der Kalibrationsbalken entspricht 10 µm.

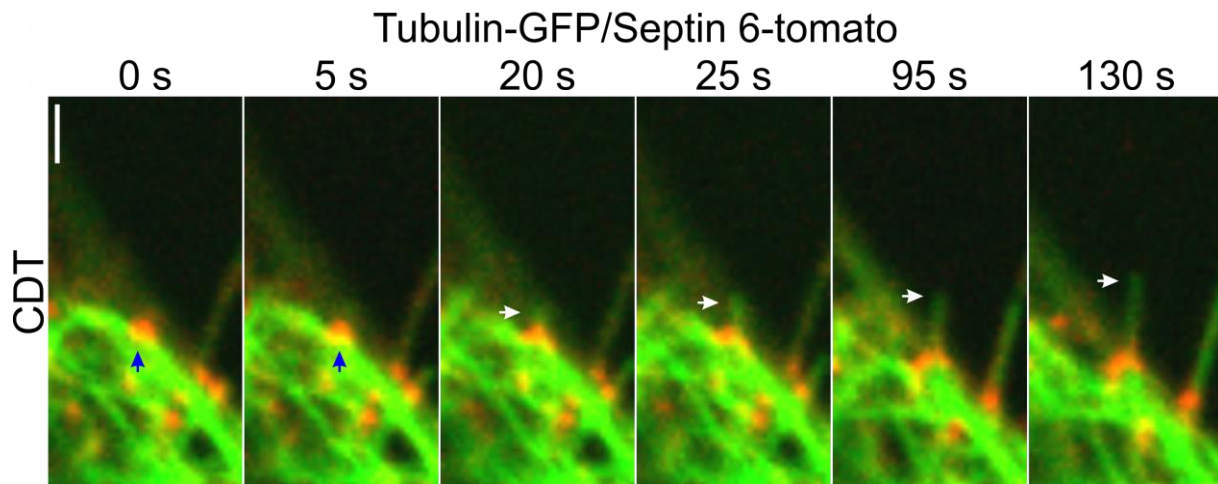


Abbildung 38: Nach der Behandlung mit CDT wachsen Mikrotubuli an Stellen von Septin-Akkumulationen über den Zellrand hinaus. Konfokale fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Mikrotubuli (grün) und Septinfilamenten (rot) in lebenden subkonfluenten Caco-2-Zellen. Die Caco-2-Zellen wurden für 24 h mit Tubulin-GFP und Septin 6-tomato cotransfiziert, mit CDT behandelt (200 ng/ml CDTa, 400 ng/ml CDTb) und nach 60 min die Fluoreszenz während der Ausläuferbildung (Framerate: 5 s) aufgenommen. Über den entsprechenden Bildausschnitten ist die jeweilige Zeit nach Beginn der Aufnahme angegeben. In den Bildausschnitten 0 s und 5 s zeigen die blauen Pfeile auf die Stelle der Septinakkumulation, an der die Ausläuferbildung beobachtet wurde. Die weißen Pfeile in den Bildausschnitten 20 s, 25 s, 95 s und 130 s zeigen auf die Spitze der Mikrotubuli des sich bildenden Ausläufers. Der Kalibrationsbalken entspricht 2 μ m.

4.2.4. Einfluss von Forchlorfenuron auf die Ausläuferbildung

Ob die beobachtete Septindynamik und die Septinstrukturen an der Ausläuferbasis für die Bildung der CDT-induzierten Zellausläufer benötigt werden, sollten Untersuchungen mit der Substanz Forchlorfenuron zeigen. Forchlorfenuron ist ein Inhibitor der Septindynamik und des Septinturnovers (Hu *et al.*, 2008; DeMay *et al.*, 2010). Es induziert die Bildung langer und stabiler Septinfilamente. In Untersuchungen von Caco-2-Zellen, die für 2,5 h mit Forchlorfenuron vorbehandelt worden waren, zeigte sich eine konzentrationsabhängige Hemmung der CDT-induzierten Ausläuferbildung durch Forchlorfenuron (Abbildung 39A und B). Hierbei wurde durch 50 μ M Forchlorfenuron die Ausläuferbildung nach 120 min um circa 50 % und durch 100 μ M Forchlorfenuron um circa 80 % reduziert. Die untersuchten Caco-2-Zellen wiesen keine wesentlichen zellmorphologischen Veränderungen im Vergleich zu den untersuchten Kontrollzellen auf. Wie in Abbildung 39C und D gezeigt, reduzierte Forchlorfenuron die durchschnittliche Länge und Anzahl der gemessenen Ausläufer gleichermaßen deutlich. Hier zeigte sich nach 120 min jeweils eine circa 60 %ige Reduktion der Ausläuferlänge sowie deren Anzahl durch die Vorbehandlung mit 100 μ M Forchlorfenuron.

Ob die beobachtete Hemmung der CDT-induzierten Ausläuferbildung durch Forchlorfenuron im Zusammenhang mit dessen Septin-spezifischer Wirkung stand oder ob diese Substanz Einfluss auf die CDT-Aufnahme, dessen Aktivität oder andere zytoskelettale Komponenten hatte, wurde im Folgenden näher untersucht. Hierfür wurden Caco-2-Zellen für 2,5 h mit 100 μ M Forchlorfenuron oder mit 1 μ g/ml Dimethylsulfoxid zur Vehikelkontrolle vorbehandelt. Danach wurden die Zellen mit CDT behandelt. Anschließend wurden die Zellen fixiert und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen des Aktinzytoskeletts durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass Forchlorfenuron nach 4 h eine vermehrte Stressfaserbildung des Aktinzytoskeletts induziert hatte, sonst waren keine wesentlichen Einflüsse sichtbar. In den Zellen, die nach 2,5 h Forchlorfenuronbehandlung für 1,5 h mit CDT behandelt wurden, zeigte sich kein wesentlicher Einfluss der Forchlorfenuronbehandlung auf die CDT-induzierte Depolymerisation des Aktinzytoskeletts (Abbildung 41A). Um dies weiter zu untersuchen, wurden Caco-2-Zellen mit 100 μ M Forchlorfenuron behandelt. Zusätzlich wurden die Zellen nach 2,5 h mit CDT behandelt. Nach jeweils 1 h und 2 h wurden die CDT-behandelten Zellen lysiert und ADP-Nachribosylierungsexperimente mit den Zelllysaten durchgeführt (Abbildung 41B). Bei diesen Untersuchungen war kein wesentlicher Einfluss von Forchlorfenuron auf die ADP-Ribosylierung von Aktin durch CDT erkennbar. Auch konnte in fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen mit Alexa 568-markiertem CDTb kein Einfluss von Forchlorfenuron auf die Bindung und die Aufnahme von CDT nachgewiesen werden (Abbildung 40). Zusätzlich wurde untersucht, ob Forchlorfenuron einen Einfluss auf das Mikrotubulizytoskelett hatte, was die hemmende Wirkung auf die Ausläuferbildung erklären könnte. Das Mikrotubulizytoskelett zeigte sich in Forchlorfenuron-behandelten Caco-2-Zellen morphologisch unverändert. Sowie vor und nach CDT-Behandlung ließ sich keine Wirkung von Forchlorfenuron erkennen (Abbildung 42).

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen des Einflusses von Forchlorfenuron auf das Septinzytoskelett in Caco-2-Zellen zeigten einen Effekt auf das Septinzytoskelett in CDT-vergifteten und unvergifteten Zellen. Forchlorfenuron führte hier zur Bildung längerer und dickerer Septinfilamente im Vergleich zu Kontrollzellen. In Kontrollzellen zeigte sich auch die in den Abschnitten 4.2.1 und 4.2.2 beschriebene CDT-induzierte Umorganisation des Septinzytoskeletts, während in Forchlorfenuron-vorbehandelten Zellen längere Septinfilamente auch nach CDT-Behandlung zu beobachten waren. Außerdem hatten sich unter Forchlorfenuroneinfluss deutlich weniger Septinringe und trichterförmige Septinstrukturen am zellulären Kortex gebildet (Abbildung 43).

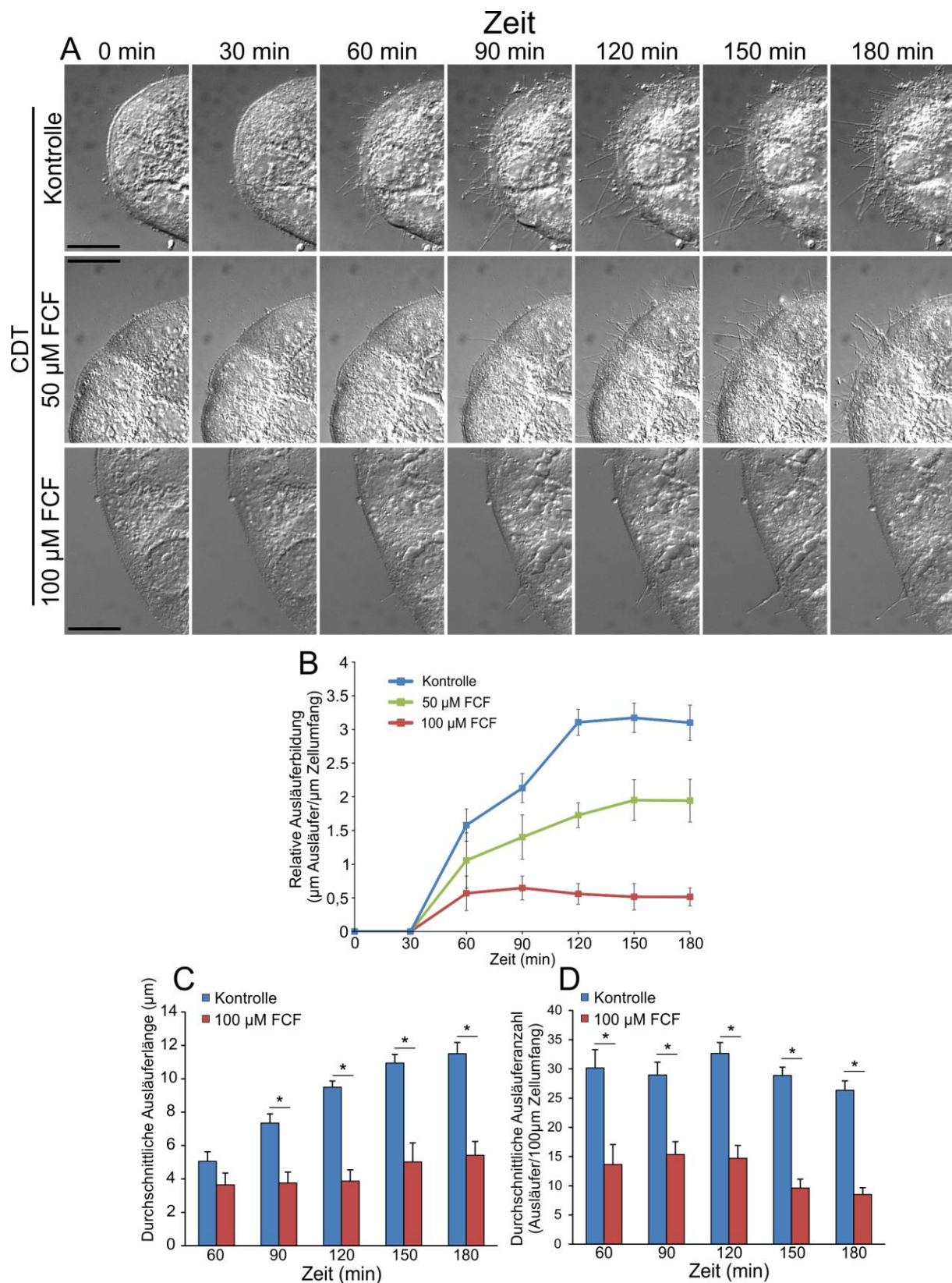


Abbildung 39: Die Behandlung von Caco-2-Zellen mit Forchlorfenuron hemmt die CDT-induzierte Ausläuferbildung.

(A) Bildausschnitte aus DIC-lebendzellmikroskopischen Experimenten, die mit subkonfluenten Caco-2-Zellen durchgeführt wurden, welche zuvor für 2,5 h mit aufsteigenden Konzentrationen von Forchlorfenuron (FCF) behandelt wurden (50 und 100 μM) oder mit Dimethylsulfoxid (1 $\mu\text{l/ml}$) als Vehikelkontrolle (Kontrolle). Anschließend wurden die Zellen mit CDT behandelt (200 ng/ml CDTa, 400 ng/ml CDTb) und die Ausläuferbildung für 180 min aufgenommen. Dargestellt sind repräsentative Bildausschnitte aus diesen Experimenten. Für jeden Bildausschnitt ist die jeweilige CDT-Behandlungszeit und die Forchlorfenuronkonzentration angegeben. Die Kalibrationsbalken entsprechen 20 μm . (B) Quantifizierung der

Ausläuferbildung aus verschiedenen DIC-lebendzellmikroskopischen Experimenten nach CDT-Behandlung (200 ng/ml CDTa, 400 ng/ml CDTb). Alle 30 min wurde die Länge der gebildeten Ausläufer summiert und gegen den Zellumfang normalisiert, dargestellt als relative Ausläuferbildung (μm Ausläufer/ μm Zellumfang). Abgebildet ist der Effekt der unterschiedlichen Forchlorfenuronkonzentrationen auf die Ausläuferbildung (grün: 50 μM ; rot: 100 μM). Als blaue Kurve ist die Ausläuferbildung der Kontrollzellen dargestellt, diese wurden zur Vehikelkontrolle mit 1 $\mu\text{l/ml}$ Dimethylsulfoxid vorbehandelt. **(C)** Quantifizierung der Ausläuferbildung. Alle 30 min wurde die Länge der gebildeten Ausläufer summiert und durch ihre Anzahl dividiert, dargestellt als durchschnittliche Ausläuferlänge in μm . Gemessen wurde die Ausläuferlänge in subkonfluenten Caco-2-Zellen, die für 2,5 h mit 100 μM Forchlorfenuron vorbehandelt wurden (rote Balken) oder mit 1 $\mu\text{l/ml}$ Dimethylsulfoxid (blaue Balken). Sie wurden je mit 200 ng/ml CDTa und 400 ng/ml CDTb behandelt. **(D)** Quantifizierung der Ausläuferbildung. Alle 30 min wurden die Ausläufer gezählt und gegen 100 μm Zellumfang normalisiert. Dargestellt als Anzahl der Ausläufer/100 μm Zellumfang. Gemessen wurde die Ausläuferanzahl in subkonfluenten Caco-2-Zellen, die mit 100 μM Forchlorfenuron für 2,5 h vorbehandelt wurden (rote Balken) oder mit 1 $\mu\text{l/ml}$ Dimethylsulfoxid (blaue Balken). Sie wurden je mit 200 ng/ml CDTa und 400 ng/ml CDTb behandelt. In B, C und D stellen die Fehlerindikatoren den Standardfehler ≥ 7 Positionen aus 3 Experimenten dar. Signifikante Unterschiede zwischen den Stichproben und den Kontrollen sind durch ein „*“ markiert.

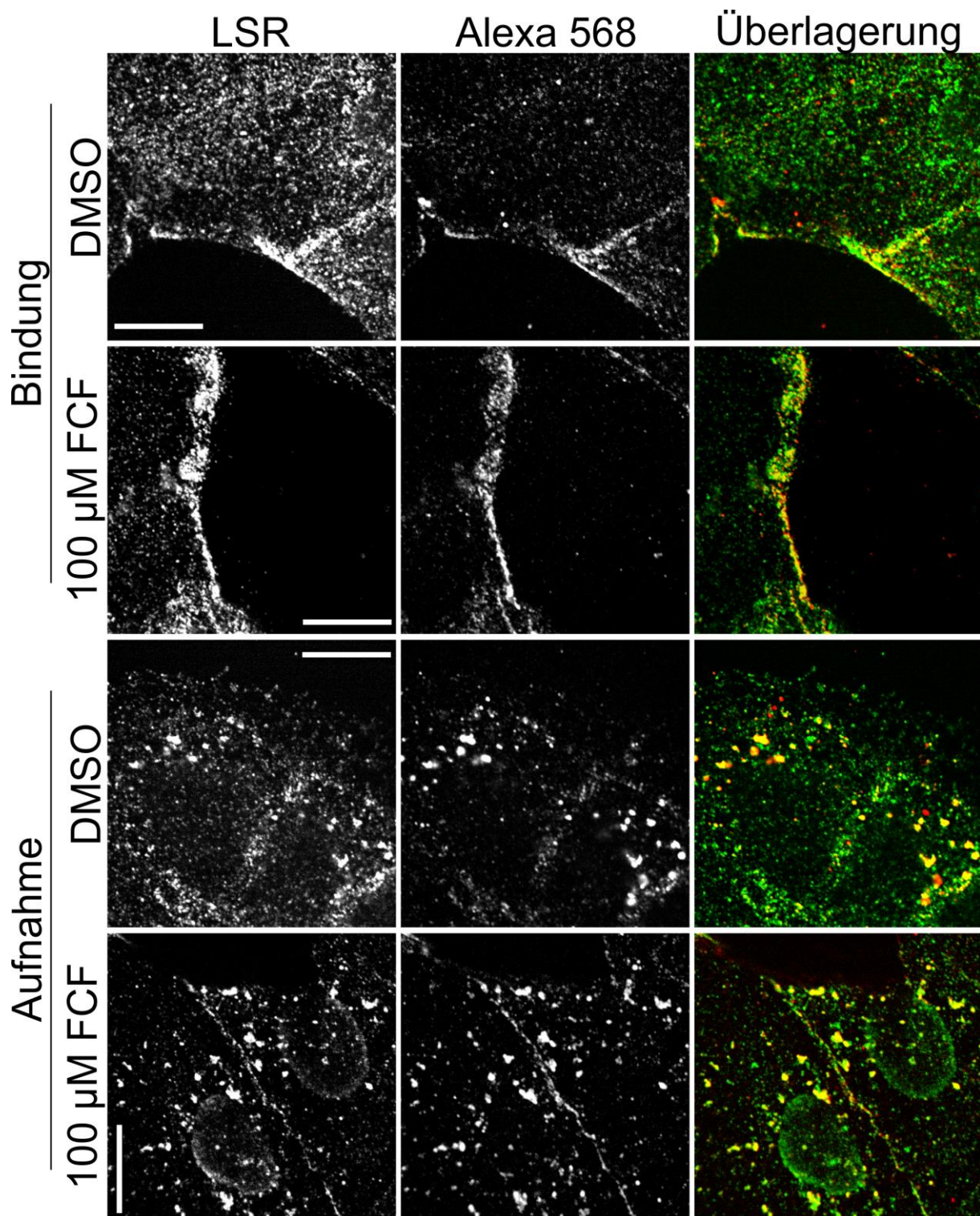


Abbildung 40: Der Einfluss von Forchlorfenuron auf die Bindung und Aufnahme von CDT. Die konfokalen fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigen den Wirtszellrezeptor von CDT (*lipolysis stimulated lipoprotein receptor*, LSR), der durch indirekte Immunfluoreszenz sichtbar gemacht wurde, und Alexa 568-markiertes CDTb. Subkonfluente Caco-2-Zellen wurden mit 100 µM Forchlorfenuron (FCF) oder mit 1 µg/ml Dimethylsulfoxid (DMSO) für 2,5 h vorbehandelt. Im Anschluss wurden die Zellen auf 4°C herabgekühlt und mit 2 µg/ml CDTa und 2 µg/ml Alexa 568-markiertem CDTb behandelt. Nach 15 min wurden die Zellen entweder auf 37°C erwärmt und für 20 min inkubiert (Aufnahme) oder für 20 min bei 4°C belassen (Bindung). Anschließend wurden die Zellen fixiert und immunzytochemisch behandelt. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte aus den beschriebenen Experimenten. Die Kalibrationsbalken entsprechen 10 µm.

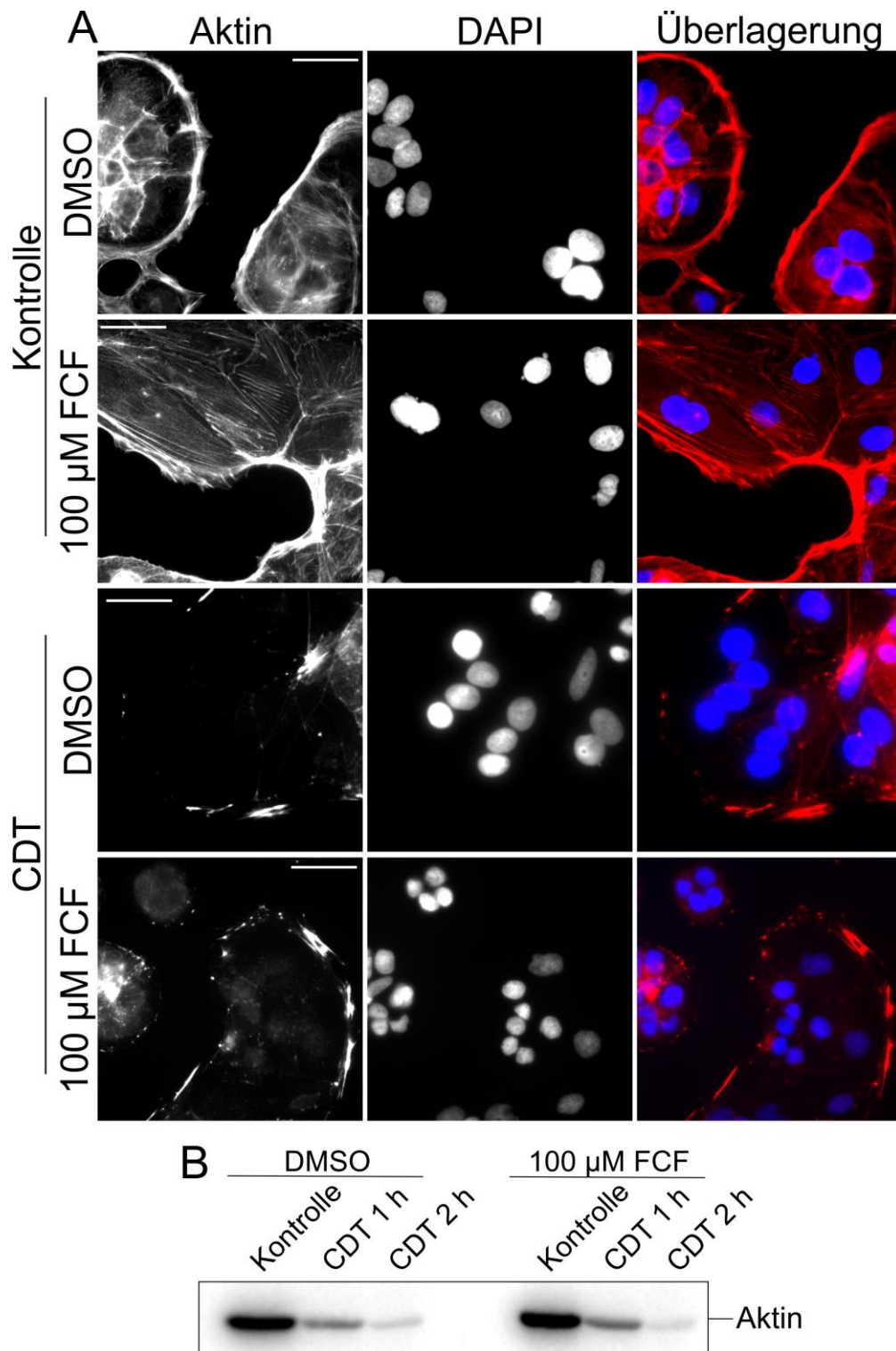


Abbildung 41: Einfluss von Forchlorfenuron auf die Aktivität von CDT in Caco-2-Zellen. (A) Epifluoreszenzmikroskopische Untersuchungen subkonfluenten Caco-2-Zellen. Dargestellt ist das Aktinzytoskelett durch Phalloidin-Tetramethylrhodamin und die Zellkerne durch DAPI. Die Caco-2-Zellen wurden mit 100 μ M Forchlorfenuron (FCF) oder mit 1 μ g/ml Dimethylsulfoxid (DMSO) für 2,5 h vorbehandelt. Die Caco-2-Zellen wurden für 90 min mit CDT behandelt (200 ng/ml CDTa, 400 ng/ml CDTb) oder blieben unbehandelt (Kontrolle). Die Kalibrationsbalken entsprechen 40 μ m. (B) Dargestellt ist ein repräsentatives Autoradiogramm von ADP-Nachribosylierungsexperimenten, die mit Lysaten von Caco-2-Zellen durchgeführt wurden. Die Zellen wurden mit 100 μ M Forchlorfenuron (FCF) oder mit 1 μ g/ml Dimethylsulfoxid (DMSO) für 2,5 h vorbehandelt. Anschließend wurden die Caco-2-Zellen für die angegebenen Zeiträume mit CDT behandelt (100 ng/ml CDTa, 200 ng/ml CDTb) oder blieben unbehandelt (Kontrolle). Die so behandelten Zellen wurden lysiert und unmodifiziertes G-Aktin in den Zelllysaten in Gegenwart von [32 P]NAD durch C2I „nachribosyliert“. Die Lysate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Das Acrylamidgel wurde im Phosphorimager ausgelesen.

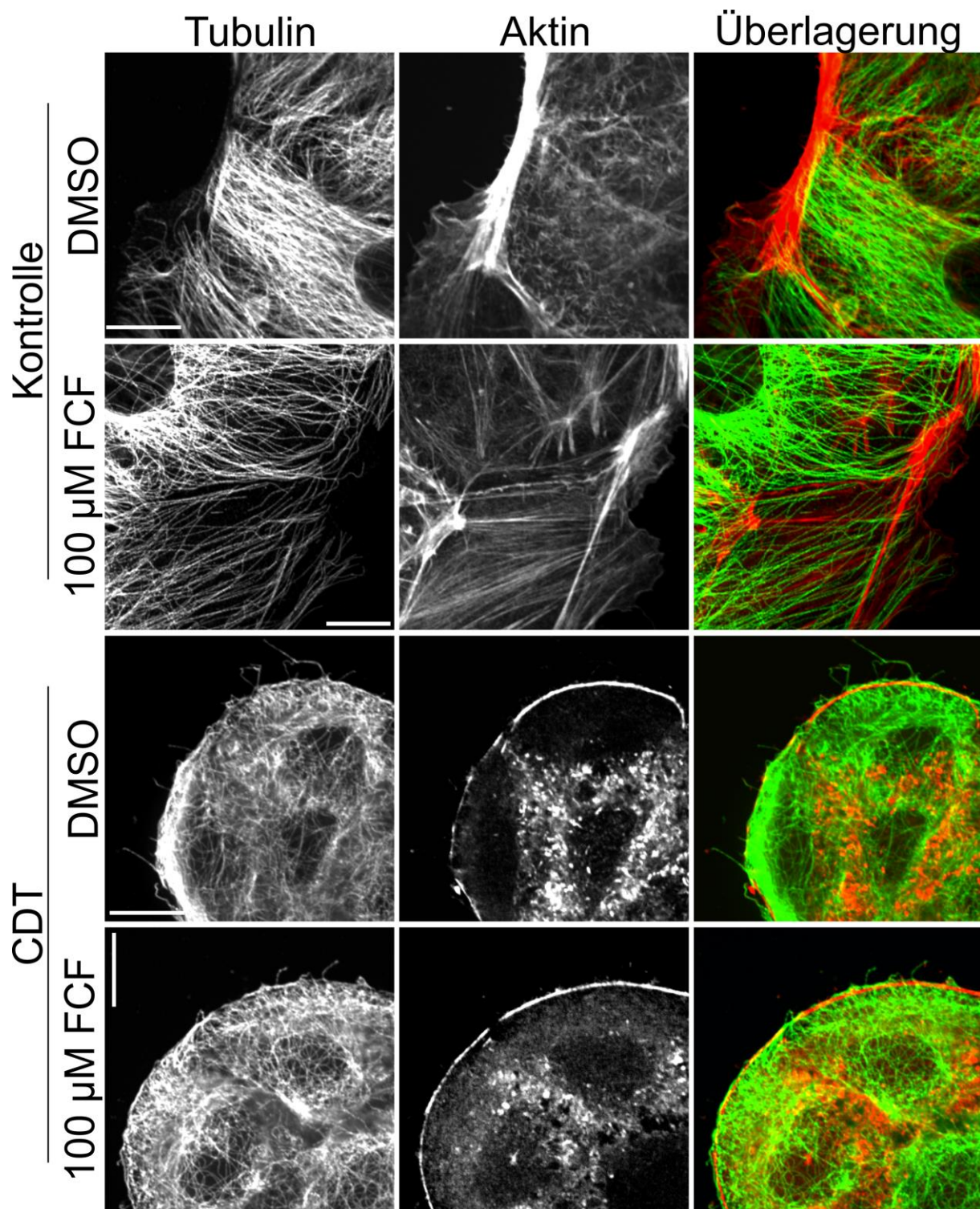


Abbildung 42: Effekte von Forchlorfenuron auf das Aktin- und Mikrotubulizytoskelett. Konfokale fluoreszenzmikroskopische Darstellung des Mikrotubulizytoskeletts durch indirekte Immunfluoreszenz und des Aktinzytoskeletts durch Phalloidin-Tetramethylrhodamin. Subkonfluente Caco-2-Zellen wurden mit 100 µM Forchlorfenuron (FCF) oder mit 1 µg/ml Dimethylsulfoxid (DMSO) für 2,5 h vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen für 90 min mit CDT behandelt (200 ng/ml CDTa, 400 ng/ml CDTb) oder unbehandelt belassen (Kontrolle). Anschließend wurden die Zellen fixiert. Die Kalibrationsbalken entsprechen 10 µm.

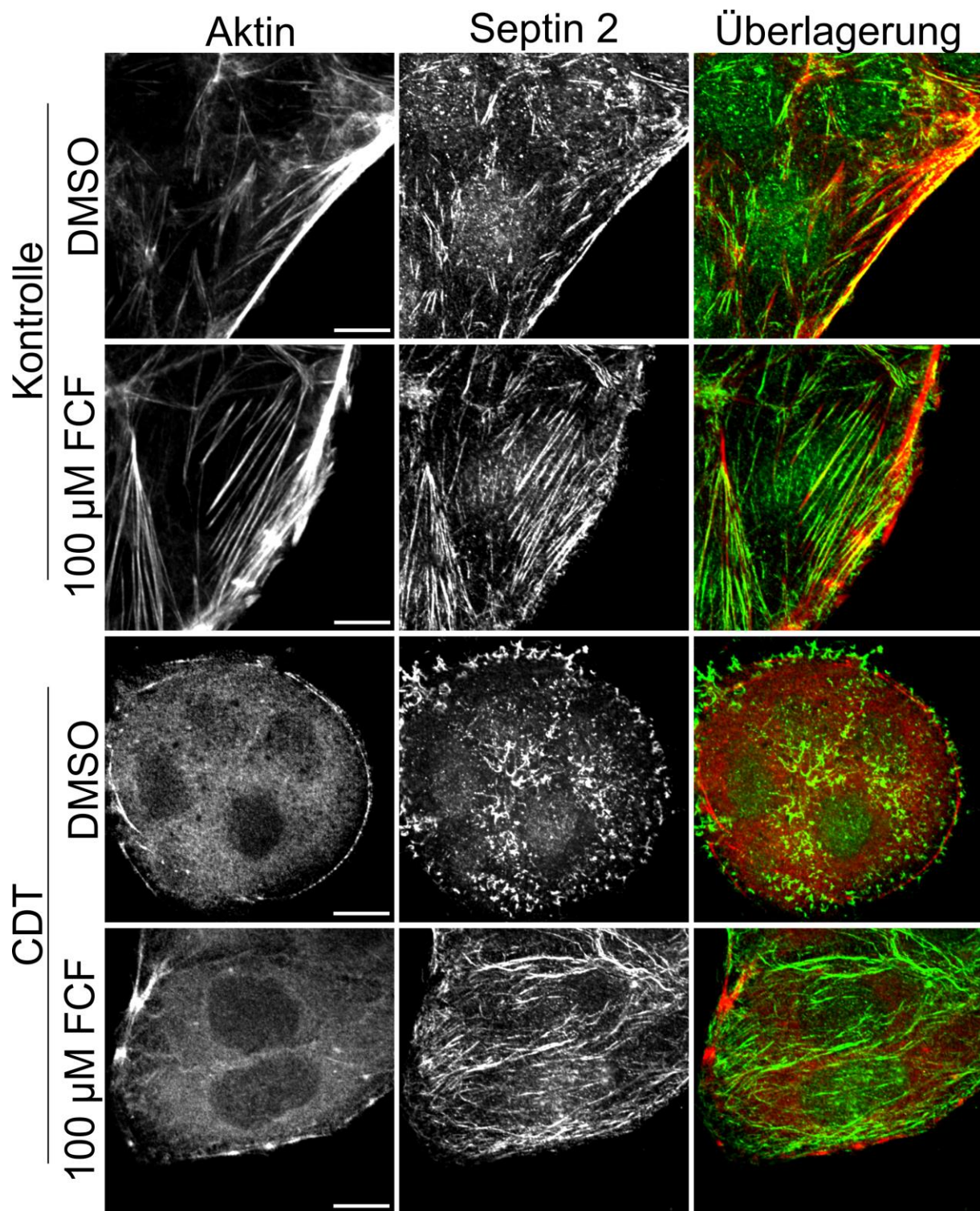


Abbildung 43: Effekte von Forchlorfenuron auf das Septin- und Aktinzytoskelett. Konfokale fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Septinzytoskeletts durch indirekte Immunfluoreszenz und des Aktinzytoskeletts durch Phalloidin-Tetramethylrhodamin. Subkonfluente Caco-2-Zellen wurden mit 100 µM Forchlorfenuron (FCF) oder mit 1 µg/ml Dimethylsulfoxid (DMSO) für 2,5 h vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen für 90 min mit CDT behandelt (200 ng/ml CDTa, 400 ng/ml CDTb) oder unbehandelt belassen (Kontrolle). Die Kalibrationsbalken entsprechen 10 µm.

4.2.5. Einfluss der Überexpression einzelner Septine auf die Ausläuferbildung

Für unterschiedliche Septinmonomere wurde eine individuelle Funktion bei verschiedenen zellulären Prozessen beschrieben (Xie *et al.*, 2007; Cho *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2012; Mostowy *et al.*, 2009a; Mostowy *et al.*, 2009b). Es sollte nun geprüft werden, ob dies auch für die CDT-induzierte Ausläuferbildung zutrifft. Hierfür wurden Caco-2-Zellen mit verschiedenen GFP-Konstrukten der Septine 2, 6 oder 7 transfiziert, deren endogene Beteiligung an der Bildung der Septinstrukturen an der Ausläuferbasis bereits durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen gezeigt werden konnte. Abbildung 44 zeigt konfokale fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Caco-2-Zellen, die jeweils mit einem GFP-Konstrukt der Septine 2, 6, oder 7 und pHcRed1-Nuc, einem nukleären Marker, cotransfiziert wurden. Bei diesen Untersuchungen war zu beobachten, dass die synthetisierten Septin-GFP-Fusionsproteine in das Septinzytoskelett der Zellen inkorporiert wurden. Es waren keine Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Septinen sichtbar und auch ein genereller Einfluss der Septin-GFP-Expression auf die Organisation des Septinzytoskeletts ließ sich nicht beobachten.

Um den Einfluss der einzelnen Septine auf die CDT-induzierte Ausläuferbildung zu messen, wurden Caco-2-Zellen mit den einzelnen Konstrukten transfiziert und durch videomikroskopische Untersuchungen deren Effekt auf die CDT-induzierte Ausläuferbildung bestimmt. Ein Einfluss der Septine 6 und 7 auf die CDT-induzierte Ausläuferbildung war feststellbar, während die Überexpression von Septin 2 keinen signifikanten Einfluss hatte. Nach 120 min wurde in Septin 6-GFP- und Septin 7-GFP-überexprimierenden Zellen eine um circa 50 % höhere relative Ausläuferbildung im Vergleich zu den mit dem pEGFP-N1-Vektor transfizierten Zellen gemessen (Abbildung 45A). Es zeigte sich, dass in den Septin 6- und Septin 7-überexprimierenden Zellen die Ausläuferanzahl und -länge signifikant erhöht waren (Abbildung 45B und C). In Caco-2-Zellen, die mit den verschiedenen Septin-GFP-Konstrukten transfiziert worden waren, wurde ebenfalls der Einfluss der unterschiedlichen Septine auf den Durchmesser der CDT-induzierten Ausläufer bestimmt. Hier wurde erkennbar, dass in Zellen, die mit Septin 6-GFP oder Septin 7-GFP transfiziert worden waren, der Durchmesser der Ausläufer um 30 % erhöht war. Die Expression von Septin 2-GFP hatte dagegen keinen Einfluss auf den Ausläuferdurchmesser (Abbildung 46).

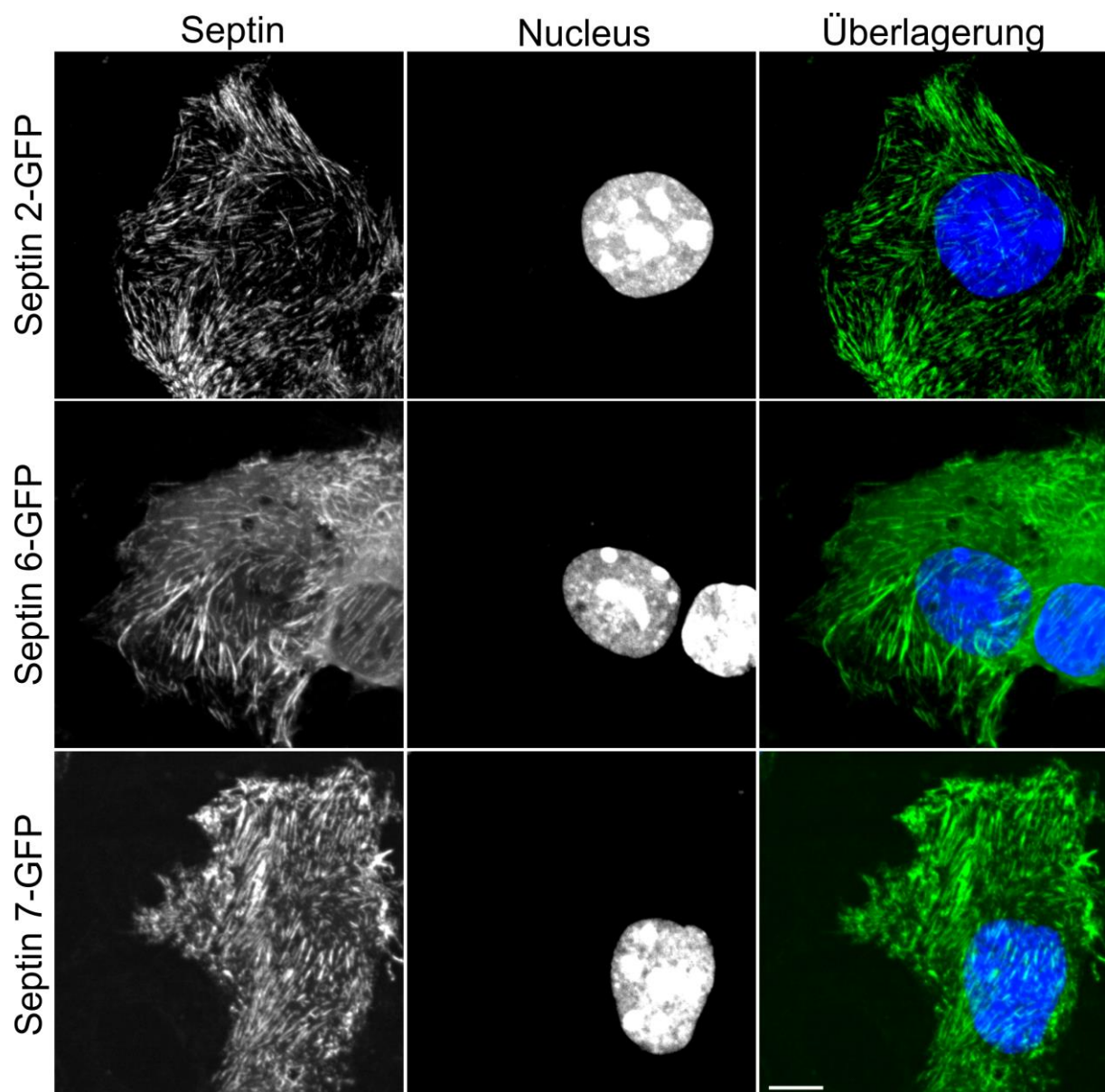


Abbildung 44: Expression verschiedener Septin-GFP-Konstrukte in Caco-2-Zellen. Dargestellt sind konfokale fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Fluoreszenz von verschiedenen Septin-GFP-Konstrukten und pHcRed1-Nuc, einem viralen nukleären Signalpeptid. Die Zellen wurden für 48 h mit der Plasmid-DNA transfiziert und die Fluoreszenz der lebenden Caco-2-Zellen aufgenommen. Dargestellt sind repräsentative Bildausschnitte. Der Kalibrationsbalken entspricht 10 μm .

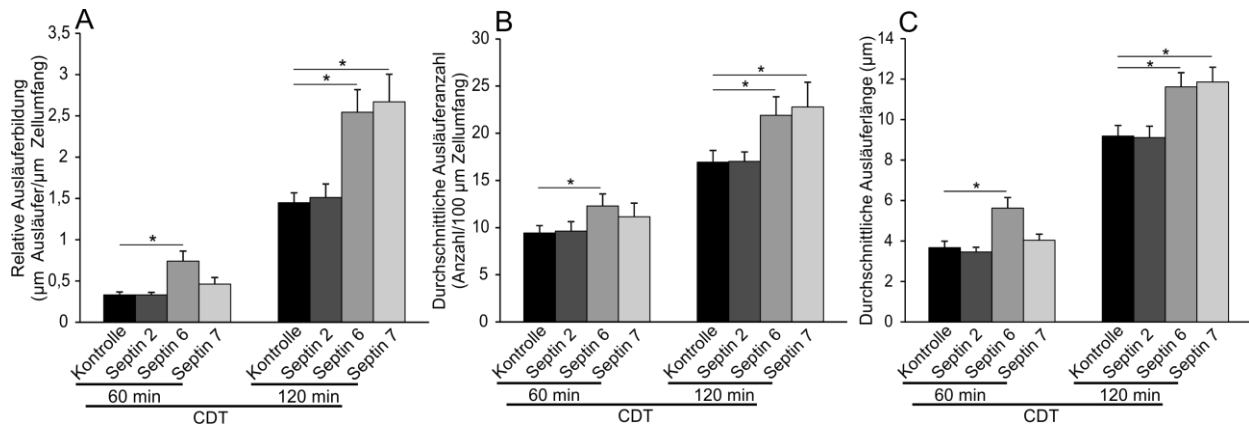


Abbildung 45: Einfluss der Überexpression verschiedener Septin-GFP-Konstrukte auf die CDT-induzierte Ausläuferbildung. (A) Quantifizierung der Ausläuferbildung. Caco-2-Zellen wurden für 48 h mit unterschiedlichen Septin-GFP-Konstrukten transfiziert (Septin 2, Septin 6 oder Septin 7) oder mit dem pEGFP-N1-Vektor als Kontrolle. Sie wurden mit CDT behandelt (200 ng/ml CDTa, 400 ng/ml CDTb) und die Ausläuferbildung über 120 min aufgenommen. Anschließend wurde die Ausläuferbildung fluoreszenter Zellen gemessen. Dargestellt ist die relative Ausläuferbildung (μm Ausläufer/ μm Zellumfang). Hierfür wurden zu den angegebenen Zeitpunkten die Längen der Ausläufer addiert und gegen den Zellumfang normalisiert. (B) Quantifizierung der Ausläuferbildung. Gleiche Daten wie in A. Dargestellt ist die durchschnittliche Ausläuferanzahl pro 100 μm Zellumfang. Hierfür wurde die Anzahl der Ausläufer zu den angegebenen Zeitpunkten addiert und gegen 100 μm Zellumfang normalisiert. (C) Quantifizierung der Ausläuferbildung. Gleiche Daten wie in A. Dargestellt ist die durchschnittliche Ausläuferlänge in μm . Hierfür wurden zu den angegebenen Zeitpunkten die Ausläuferlängen addiert und durch ihre Anzahl dividiert. Die Fehlerindikatoren in A, B und C geben den Standardfehler von ≥ 75 Zellen je Gruppe aus ≥ 3 unabhängigen Experimenten an. Signifikante Unterschiede zwischen den Stichproben und den Kontrollen sind durch ein „*“ markiert.

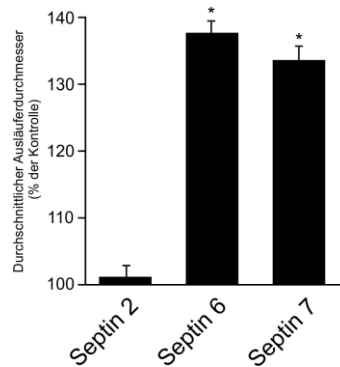


Abbildung 46: Einfluss der Expression verschiedener Septin-GFP-Konstrukte auf den Durchmesser CDT-induzierter Ausläufer. Quantifizierung des Ausläuferdurchmessers, dargestellt als % der Kontrolle. Hierfür wurden die Zellen für 48 h mit verschiedenen Septin-GFP-Konstrukten transfiziert (Septin 2, Septin 6 oder Septin 7). Als Kontrolle wurde die CDT-induzierte Ausläuferbildung in Caco-2-Zellen gemessen, die mit dem pEGFP-N1-Vektor transfiziert worden waren. Die Zellen wurden mit CDT behandelt (200 ng/ml CDTa, 400 ng/ml CDTb) und anschließend die Ausläuferbildung über 120 min aufgenommen. Anschließend wurde der Durchmesser der entstandenen Ausläufer fluoreszenter Zellen nach 120 min gemessen. Dieser wurde stets in der Mitte des jeweiligen Ausläufers bestimmt. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler von ≥ 134 Ausläufern von ≥ 30 Zellen aus ≥ 3 unabhängigen Experimenten an. Signifikante Unterschiede zwischen den Stichproben und der Kontrolle sind durch ein „*“ markiert.

4.2.6. Einfluss der Herunterregulation einzelner Septine auf die Ausläuferbildung

Nachdem beobachtet wurde, dass durch Septin-Überexpression die Bildung der CDT-induzierten Zellausläufer verstärkt werden konnte, sollte nun der Einfluss der Herunterregulation verschiedener Septine auf die CDT-induzierte Ausläuferbildung untersucht werden. Hierfür wurden shRNA-Konstrukte verwendet, deren Zielsequenzen bereits eine effektive Herunterregulation von Septinen in verschiedenen Zelllinien bewirken konnten (Sellin *et al.*, 2011b; Sellin *et al.*, 2011a). Diese Zielsequenzen richteten sich im menschlichen Transkriptom spezifisch gegen alle bekannten Isoformen der jeweiligen Septine 2, 6 oder 7. Als Kontrolle wurde eine shRNA-Sequenz benutzt, die keine signifikante Homologie zu irgendeiner Sequenz im menschlichen Transkriptom aufwies (Narvekar *et al.*, 2009). Nach der Klonierung der Septin-shRNA-Konstrukte wurde deren Funktion in HeLa-Zellen überprüft. Durch die gleichzeitige Synthese von GFP zusammen mit der shRNA-Expression vom pSUPER.retro.gfp+neo-Vektor konnten pro Gruppe je 400.000 transfizierte HeLa-Zellen durch FACS separiert und deren Septingehalt durch Immunoblot-Verfahren analysiert werden. Es zeigten sich deutliche Reduktionen der Chemolumineszenzsignale der jeweiligen Septine durch die verschiedenen shRNA-Konstrukte (Abbildung 47A).

Zur Untersuchung des Einflusses der shRNA-Konstrukte auf die Ausläuferbildung wurden Caco-2-Zellen für 48 h mit den verschiedenen shRNA-Konstrukten transfiziert und die Ausläuferbildung quantifiziert. Durch die GFP-Fluoreszenz ließen sich transfizierte Zellen für videomikroskopische Untersuchungen identifizieren. Abbildung 47B zeigt die aufgenommene Fluoreszenz transfizierter Zellen und die CDT-Wirkung über die Zeit. Bei diesen Untersuchungen lebender Caco-2-Zellen zeigte sich, dass die Transfektion der verschiedenen shRNA-Konstrukte keine wesentlichen morphologischen Unterschiede zwischen den untersuchten Zellen hervorrief. Es war jedoch zu beobachten, dass Caco-2-Zellen, die mit Konstrukten transfiziert worden waren, welche shRNA-Zielsequenzen gegen Septin 6- und Septin 7-mRNA kodierten, sichtbar weniger CDT-induzierte Zellausläufer bildeten. Um diese Wirkung zu messen, wurden Caco-2-Zellen mit den verschiedenen shRNA-Konstrukten transfiziert und mit CDT behandelt. Die Ausläuferbildung wurde über 120 min aufgenommen, die Auswertung ist in Abbildung 48 dargestellt.

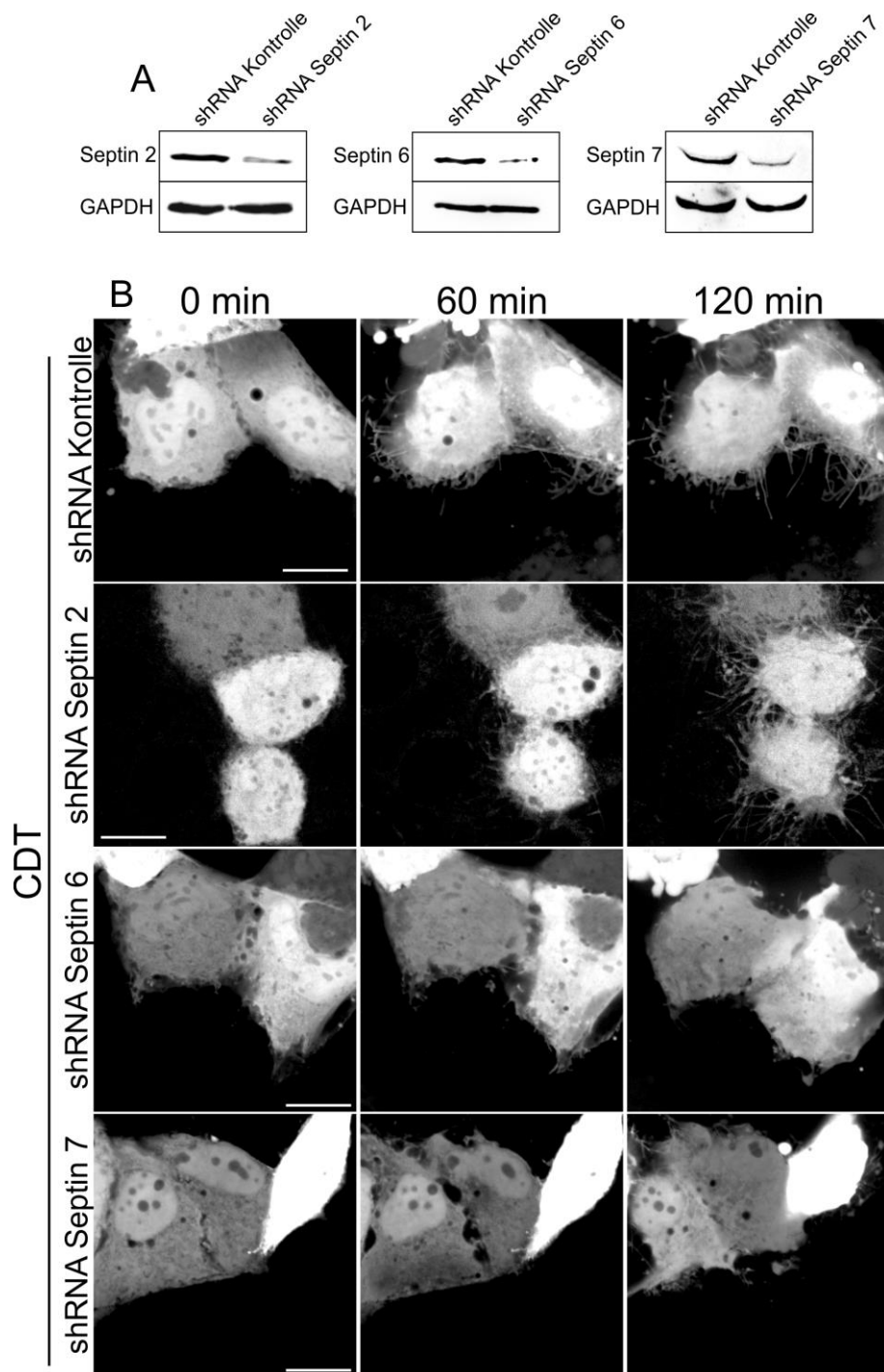


Abbildung 47: Einfluss der Herunterregulation verschiedener Septine auf die Ausläuferbildung in Caco-2-Zellen. (A) Immunoblot von HeLa-Zelllysaten, die zuvor für 48 h mit verschiedenen Septin-shRNA-Konstrukten transfiziert worden waren (shRNA Septin 2, shRNA Septin 6, shRNA Septin 7) oder mit einem Kontroll-shRNA-Konstrukt (shRNA Kontrolle). Die HeLa-Zellen wurden abtrypsinisiert und in Kulturmedium resuspendiert (10 Mio/ml). Anschließend wurden 400.000 fluoreszente HeLa-Zellen je Gruppe durch FACS aus den Suspensionen separiert und anschließend lysiert. Gleiche Mengen der Lysate wurden per SDS-PAGE aufgetrennt. Per Western-Blot und anschließender Immunodetektion wurden die entsprechenden Septine identifiziert. Als Ladekontrolle wurde die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. (B) Konfokale fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Caco-2-Zellen, die für 48 h mit verschiedenen Septin-shRNA-Konstrukten transfiziert worden waren (shRNA Septin 2, shRNA Septin 6, shRNA Septin 7) oder mit einem Kontroll-shRNA-Konstrukt (shRNA Kontrolle). Die Caco-2-Zellen wurden mit CDT behandelt (200 ng/ml CDTa, 400 ng/ml CDTb) und die GFP-Fluoreszenz über 120 min aufgenommen. Dargestellt sind repräsentative Bildausschnitte zu den angegebenen Zeitpunkten. Die Kalibrationsbalken entsprechen 20 µm.

Es zeigte sich eine Hemmung der relativen Ausläuferbildung durch die Transfektion mit Septin 6- und Septin 7-shRNA um circa 80 % nach 120-minütiger CDT-Behandlung. Dieser Einfluss der beiden shRNA-Konstrukte wurde bereits nach 60 min deutlich, hier war eine Reduktion der Ausläuferbildung um jeweils etwa 50 % messbar. Die Expression der Septin 2-shRNA hatte keinen signifikanten Effekt auf die relative Ausläuferbildung (Abbildung 48A). Wie Abbildung 48A und B zeigen, reduzierten die Septin 6- und Septin 7-shRNA jeweils die Anzahl und die Länge der CDT-induzierten Zellausläufer um circa 50 %. Mit den durchgeführten Experimenten konnte der Einfluss der Herunterregulation der Septine 2, 6 oder 7 in Caco-2-Zellen auf die Ausläuferbildung untersucht werden. Es zeigte sich, dass eine Reduktion des Septin 2-Gehalts keinen signifikanten Einfluss auf die Ausläuferbildung hatte. Die Herunterregulation der Septine 6 und 7 hatte eine deutliche Reduktion der Ausläuferbildung zur Folge. Ähnlich wie in den Überexpressionsexperimenten, zeigte sich hier eine Funktion dieser beiden Septine bei der Bildung CDT-induzierter Ausläufer.

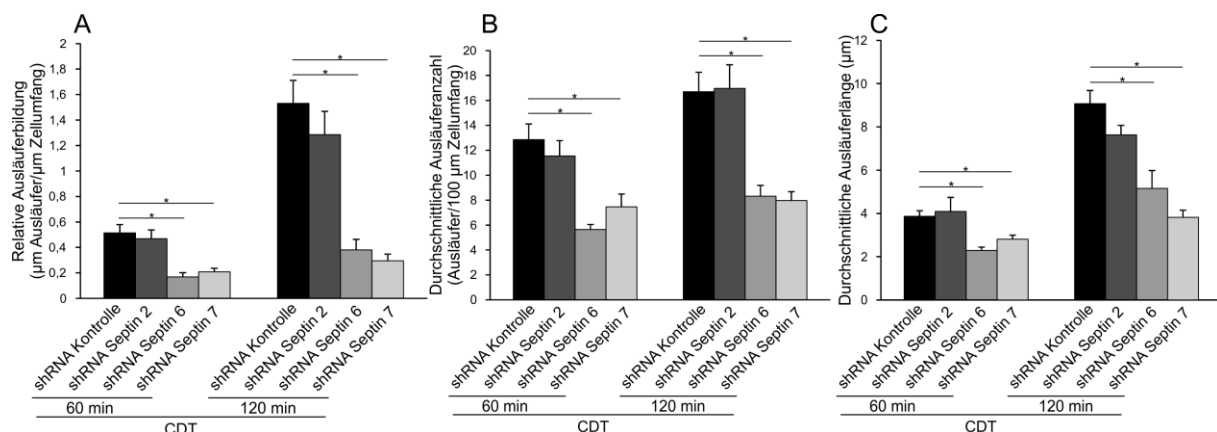


Abbildung 48: Einfluss der Expression verschiedener Septin-shRNA-Konstrukte auf die CDT-induzierte Ausläuferbildung in Caco-2-Zellen. (A) Quantifizierung der Ausläuferbildung. Die Zellen wurden für 48 h mit unterschiedlichen Septin-GFP-Konstrukten transfiziert (shRNA Septin 2, shRNA Septin 6 und shRNA Septin 7) oder mit einem Kontroll-shRNA-Konstrukt (shRNA Kontrolle). Sie wurden mit CDT behandelt (200 ng/ml CDTa, 400 ng/ml CDTb) und die Ausläuferbildung über 120 min aufgenommen. Anschließend wurde die Ausläuferbildung fluoreszenter Zellen gemessen. Dargestellt ist die relative Ausläuferbildung (μm Ausläufer/ μm Zellumfang). Hierfür wurden zu den angegebenen Zeitpunkten die Längen der Ausläufer addiert und gegen den Zellumfang normalisiert. (B) Quantifizierung der Ausläuferbildung. Gleiche Daten wie in A. Dargestellt ist die durchschnittliche Ausläuferanzahl pro 100 μm Zellumfang. Hierfür wurde die Anzahl der Ausläufer zu den angegebenen Zeitpunkten addiert und gegen 100 μm Zellumfang normalisiert. (C) Quantifizierung der Ausläuferbildung. Gleiche Daten wie in A. Dargestellt ist die durchschnittliche Ausläuferlänge in μm . Hierfür wurden zu den angegebenen Zeitpunkten die Ausläuferlängen addiert und durch ihre Anzahl dividiert. Die Fehlerindikatoren in A B und C geben den Standardfehler von ≥ 56 Zellen je Gruppe aus ≥ 3 unabhängigen Experimenten an. Signifikante Unterschiede zwischen den Stichproben und den Kontrollen sind durch ein „*“ markiert.

4.2.7. Untersuchungen zur Interaktion von Septinen mit Mikrotubuli und EB1

In weiteren Experimenten sollte geklärt werden, ob Septine spezifische Interaktionen mit Mikrotubuli oder Mikrotubuli-assoziierten Proteinen aufweisen und ob sich daraus eine Erklärung für die Funktion von Septin 6 oder 7 bei der CDT-induzierten Ausläuferbildung ergibt. Wie bei fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen beobachtet wurde (Abbildung 49) und in der Literatur bereits beschrieben ist (Spiliotis, 2010; Bowen *et al.*, 2011), assoziieren Septinfilamente mit dem Mikrotubulizytoskelett. Verschiedene Literaturstellen beschreiben die direkte Bindung einzelner Septine an Mikrotubulifilamente (Bai *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2012). Diese Bindungsstudien wurden mittels Mikrotubuli-Spindown-Experimenten oder fluoreszenzmikroskopisch durchgeführt. Auch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Mikrotubuli-Spindown-Experimente mit rekombinanten Septinen zeigten eine direkte Interaktion der Septine 6 und 7 mit Mikrotubulifilamenten. Die durchgeführten Experimente ergaben keine eindeutige Aussage für das verwendete Septin 2, da es auch in Abwesenheit von Mikrotubuli sedimentierte (Abbildung 50). Für die Durchführung der Experimente wurden die bisher in Caco-2-Zellen exprimierten Isoformen der Septine 2, 6 und 7 in den pET28a-Expressionsvektor subkloniert und die rekombinanten Proteine aus *E. coli*-Bakterien aufgereinigt (Abbildung 57 im Anhang).

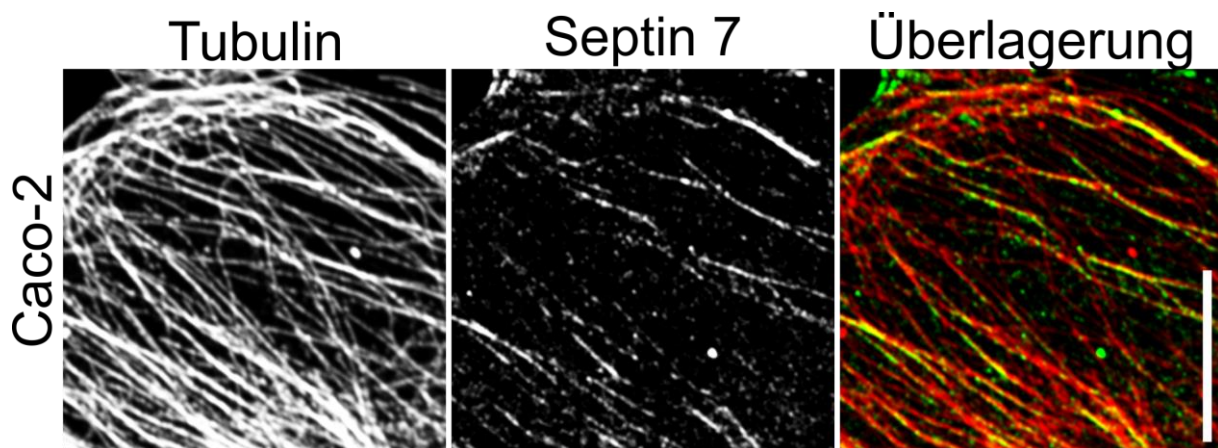


Abbildung 49: Vergrößerter Ausschnitt aus Abbildung 32. Konfokale fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des Mikrotubuli- und des Septinzytoskeletts in Caco-2-Zellen. Das Mikrotubuli- und Septinzytoskelett sind immunzytochemisch sichtbar gemacht. Der Kalibrierungsbalken entspricht 6 μm .

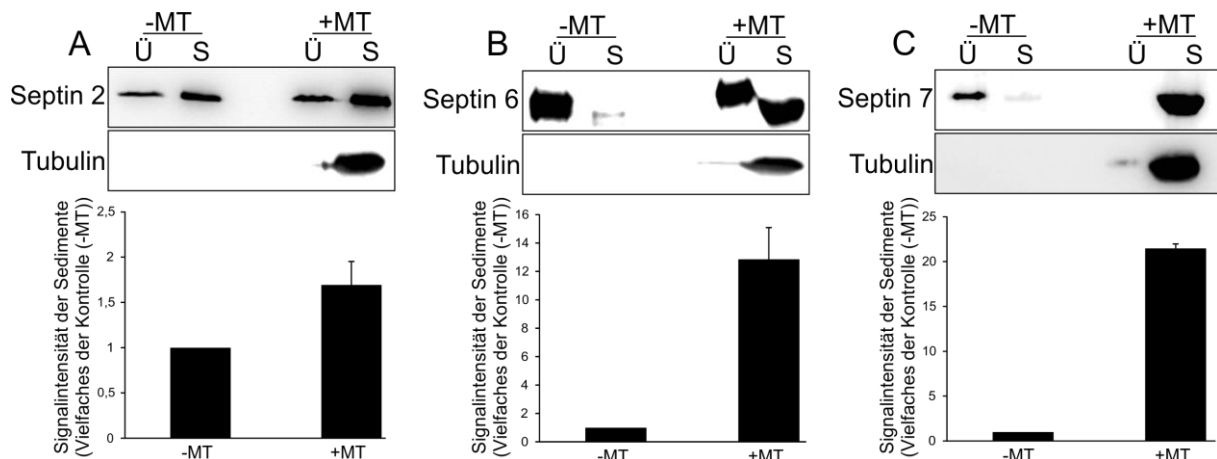


Abbildung 50: Mikrotubuli-Spindown-Experimente mit den rekombinanten Septinen 2, 6 und 7. (A) Immunoblots eines Mikrotubuli-Spindown-Experiments. 0,67 µg rekombinantes Septin 2 wurde in einem Mikrotubuli-Spindown-Experiment eingesetzt (+MT). Zur Kontrolle wurde ein Reaktionsansatz ohne Mikrotubuli mitgeführt (-MT). Der Überstand (Ü) und das Sediment (S) der beiden Reaktionsansätze wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mittels Western-Blot und Immunodetektion analysiert. Dargestellt sind die Signale des Septin 2 und des Tubulins. (B) Experiment mit rekombinantem Septin 6 durchgeführt wie in A. (C) Experiment mit rekombinantem Septin 7 durchgeführt wie in A. Die Balkendiagramme in A, B und C zeigen die Mittelwerte der Intensitäten der Septin-Signale der Sedimentfraktion von je 3 Experimenten als Vielfaches der Kontrollen (-MT). Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

Verschiedene Beobachtungen, die in lebendzellmikroskopischen Experimenten gemacht wurden legen die Vermutung nahe, dass die Mikrotubuli-assoziierten EB-Proteine mit Septinfilamenten interagieren (Bowen *et al.*, 2011). In diesen Experimenten wurde unter anderem beobachtet, dass Mikrotubuli in der Peripherie von MDCK-Zellen (Madin Darby *canine kidney*) bevorzugt entlang von Septinfilamenten polymerisieren. Auch in den hier verwendeten Caco-2-Zellen sollte dies untersucht werden. Hierfür wurden die Zellen mit Septin 6-GFP und EB1-tomato cotransfiziert und die Fluoreszenz videomikroskopisch aufgenommen. Bei der Projektion der Polymerisationsrouten der Mikrotubuli und dem Vergleich mit den Septinfilamenten konnten die gleichen Beobachtungen gemacht werden, die für MDCK-Zellen beschrieben wurden. Abbildung 51A zeigt, dass in der Peripherie von Caco-2-Zellen die Mikrotubulipolymerisationsrouten fast deckungsgleich mit den unterliegenden Septinfilamenten sind. Die Untersuchung der Mikrotubulipolymerisation und der Septinfilamente an der Basis CDT-induzierter Zellausläufer zeigte, dass Mikrotubuli entlang der Septinfilamente an der Ausläuferbasis in die Zellausläufer hinein polymerisierten (Abbildung 51B).

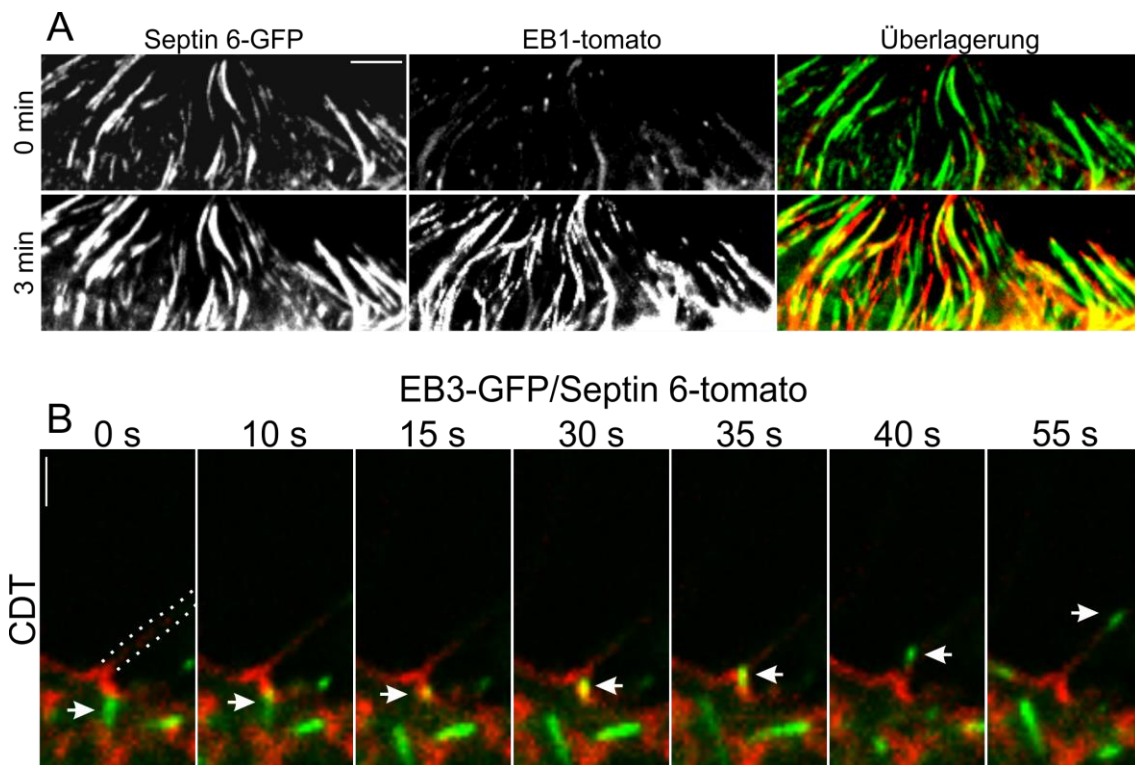


Abbildung 51: Untersuchungen zur Interaktion von EB-Proteinen mit Septinfilamenten in Caco-2-Zellen. (A) Konfokale fluoreszenzmikroskopische Projektionen aus der Peripherie von Caco-2-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h mit den Konstrukten EB1-tomato (*end binding protein 1*) und Septin 6-GFP cotransfiziert und videomikroskopisch untersucht (*Framerate*: 2 s). Dargestellt ist eine repräsentative Projektion einer 3-minütigen Aufnahme aus der Peripherie der Caco-2-Zellen (3 min). Hierfür wurden alle Fluoreszenzinformationen der beiden Kanäle über 3 min in eine Ebene projiziert und so die Polymerisationsrouten der Mikrotubuli im Verhältnis zu den Septinfilamenten sichtbar gemacht. Ebenfalls dargestellt ist der gleiche Ausschnitt zu Beginn der Aufnahme (0 min). Der Kalibrationsbalken entspricht 5 μm . (B) Konfokale fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen aus videomikroskopischen Untersuchungen von Caco-2-Zellen. Hierfür wurden die Zellen für 24 h mit EB3-GFP und Septin 6-tomato cotransfiziert. Die Zellen wurden mit CDT behandelt (200 ng/ml CDTa, 400 ng/ml CDTb) und nach 90 min die Fluoreszenz der entstandenen CDT-induzierten Ausläufer gemessen (*Framerate*: 5 s). Über den einzelnen Bildausschnitten ist die Zeit nach Beginn der Aufnahme angegeben. Dargestellt sind die Septinfilamente an der Basis eines Ausläufers (rot) und die Spitzen polymerisierender Mikrotubuli (grün). Die gestrichelte Linie zum Zeitpunkt 0 s zeichnet die seitliche Begrenzung des beobachteten Ausläufers nach. Die Pfeile zeigen auf die Spitze eines Mikrotubulus und verfolgen diese bei der Polymerisation entlang der Septinfilamente in den Zellausläufer. Der Kalibrationsbalken entspricht 2 μm .

Um die Interaktion von Septinen und EB1 weiter zu untersuchen, wurden Pulldown-Experimente durchgeführt. Hierfür wurden mit EB1-GST beladene Glutathion-Sepharosebeads oder mit GST beladene Glutathion-Sepharosebeads zur Kontrolle verwendet. Diese wurden für 90 min mit Caco-2-Zelllysaten inkubiert oder mit Lösungen rekombinanter Septine. Nach mehreren Waschschritten wurden die Beads in 5xLämmli-Probenpuffer aufgekocht und die anhaftenden Proteine durch SDS-PAGE und Immunoblot-Verfahren analysiert. Für die untersuchten Septine 2 und 7 zeigte sich eine Bindung an die EB1-GST-beladenen Beads. Dies war sowohl in Experimenten mit Zelllysaten sowie mit rekombinanten Septinen zu beobachten (Abbildung 52).

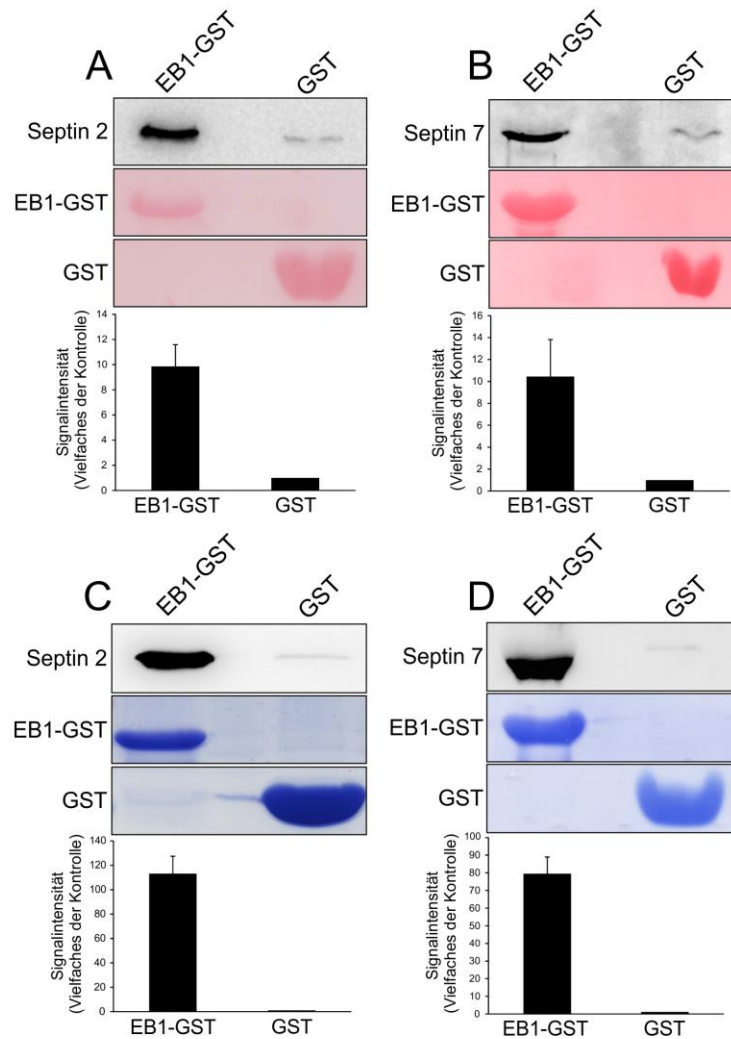


Abbildung 52: Pulldown-Experimente zur Interaktion von EB1 (*end binding protein 1*) mit Septinen. (A) Dargestellt ist ein repräsentativer Immunoblot eines Pulldown-Experiments, das mit EB1-GST-beladenen Glutathion-Sephrosebeads (EB1-GST) oder mit GST-beladenen Glutathion-Sephrosebeads (GST) als Kontrolle und Caco-2-Zelllysate durchgeführt wurde. Die Blotmembran wurde mit α -Septin 2 Antikörper inkubiert. Das Septin 2-Signal der Blotmembran ist hier dargestellt. (B) Experiment durchgeführt wie in A. Hier wurde die Blotmembran mit α -Septin 7 Antikörper inkubiert. Das Septin 7-Signal der Blotmembran ist hier dargestellt. Durch Ponceau-Färbung der Blotmembranen in A und B wurde das eingesetzte EB1-GST und die GST sichtbar gemacht. Die Säulendiagramme in A und B zeigen die Durchschnittswerte von Messungen der Intensität der Septinsignale von je 4 unabhängigen Experimenten. Dargestellt als Vielfaches der Kontrolle (GST). Die verwendeten Zelllysate hatten eine Proteinkonzentration von 2,2-2,7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Die Konzentration von EB1-GST betrug etwa 0,2 μM . (C) Dargestellt ist ein repräsentativer Immunoblot eines Pulldown-Experiments, das mit EB1-GST-beladenen Glutathion-Sephrosebeads (EB1-GST) oder mit GST-beladenen Glutathion-Sephrosebeads (GST) als Kontrolle und rekombinantem Septin 2 durchgeführt wurde. Die Blotmembran wurde mit α -Septin 2 Antikörper inkubiert. Das Septin 2-Signal der Blotmembran ist hier dargestellt. (D) Dargestellt ist ein repräsentativer Immunoblot eines Pulldown-Experiments, das mit EB1-GST-beladenen Glutathion-Sephrosebeads (EB1-GST) oder mit GST-beladenen Glutathion-Sephrosebeads (GST) als Kontrolle und rekombinantem Septin 7 durchgeführt wurde. Die Blotmembran wurde mit α -Septin 7 Antikörper inkubiert. Das Septin 7-Signal der Blotmembran ist hier dargestellt. Durch Auftrennen gleicher Mengen der Proben durch SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung der Gele in C und D ist ein Vergleich der eingesetzten Mengen von GST-EB1 und GST möglich. Die Säulendiagramme in C und D zeigen die Durchschnittswerte von Messungen der Intensität der Septinsignale von je 3 unabhängigen Experimenten. Dargestellt als Vielfaches der Kontrolle (GST). Die verwendeten Septin 2-Lösung hatte eine Proteinkonzentration von 1,25 μM die Septin 7-Lösung eine Konzentration von 0,45 μM . Die Konzentration von EB1-GST betrug jeweils etwa 1,5 μM . Die Fehlerindikatoren in A, B, C und D geben den Standardfehler der Messungen an.

Eine andere Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen ist die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie. In den hier durchgeführten Experimenten wurden verschiedene rekombinante 6xHistidin-getaggte Septine über Ni^{2+} -Ionen an einen NTA-Sensorchip gekoppelt. Nacheinander wurden unterschiedlich konzentrierte EB1-GST- oder GST-Lösungen (3,7-11,11-33,33-100-300 nM in Laufpuffer) über den so präparierten Sensorchip geleitet und das Sensogramm aufgezeichnet. EB1-GST zeigte eine hohe Affinität zu den gekoppelten Septinen 2, 6 und 7 (Septin 2: $\text{KD} = 80,75 \pm 12,38 \text{ nM}$, Septin 6: $\text{KD} = 19,85 \pm 10,97 \text{ nM}$, Septin 7: $\text{KD} = 26,16 \pm 3,51 \text{ nM}$) (Abbildung 53). GST zeigte keinerlei Bindung an die so präparierte Chipoberfläche.

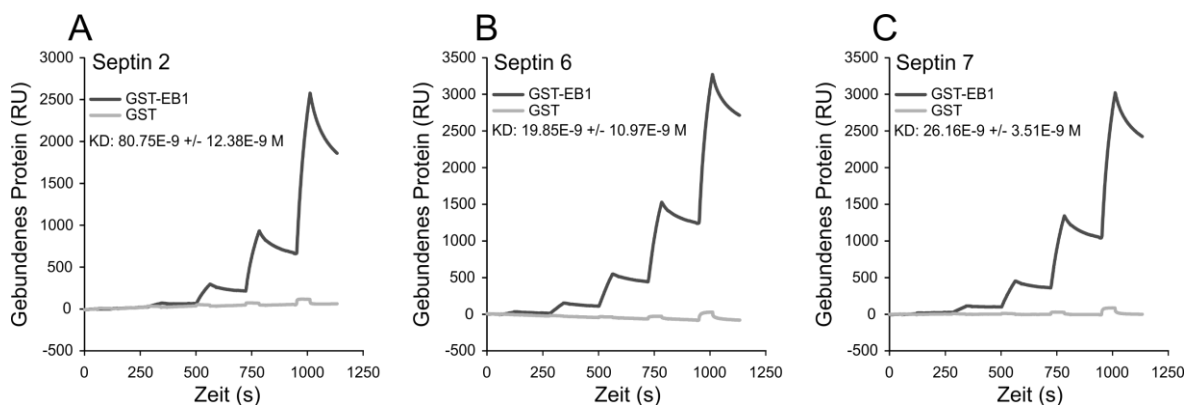


Abbildung 53: Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie zur Interaktion von EB1 (*end binding protein 1*) mit Septinen. (A) Repräsentives Sensogramm von GST-EB1 und GST, die über einen Sensorchip mit immobilisiertem Septin 2 geleitet wurden. (B) Repräsentives Sensogramm von GST-EB1 und GST, die über einen Sensorchip mit immobilisiertem Septin 6 geleitet wurden. (C) Repräsentives Sensogramm von GST-EB1 und GST, die über einen Sensorchip mit immobilisiertem Septin 7 geleitet wurden. Der KD-Wert in A, B und C stellt den Mittelwert von je 4 unabhängigen Experimenten dar. Angegeben ist der Standardfehler aus diesen Experimenten. Die Konzentrationen der EB1-GST- und GST-Lösungen betrugen (3,7-11,11-33,33-100-300 nM).

4.2.8. F-Aktin-Unabhängigkeit der CDT-induzierten Ausläuferbildung

Bei zellulären Protrusionen in verschiedenen Zelltypen und Organismen wurde bereits die Beteiligung von Septinen beschrieben (Tada *et al.*, 2007; Dagdas *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2012). Stets spielt das Aktinzytoskelett eine Rolle bei diesen protrusiven Aktivitäten am zellulären Kortex und der dabei stattfindenden Koordination der zytoskelettalen Komponenten. Die zytoskelettale Grundlage der in der vorliegenden Arbeit untersuchten CDT-induzierten Zellausläufer bilden Mikrotubuli sowie Septinfilamente. In den folgenden Experimenten sollte das Aktinzytoskelett bei der CDT-induzierten Ausläuferbildung näher untersucht werden, um eine Funktion von F-Aktin bei der Bildung der Toxin-induzierten Zellausläufer auszuschließen. Epifluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der verschiedenen zytoskelettalen Komponenten in Caco-2-Zellen zeigten, dass an den Stellen der CDT-induzierten Ausläufer am zellulären Kortex nach 120-minütiger CDT-Behandlung kein

F-Aktin lokalisiert war. Hingegen waren Mikrotubuli und die typischen trichterförmigen Septinstrukturen an der Basis der Ausläufer zu beobachten. In unbehandelten Caco-2-Zellen bildeten Aktin-, Mikrotubuli- und Septinfilamente gemeinsam das Zytoskelett am zellulären Kortex (Abbildung 54).

Zur Untersuchung der Dynamik des Aktin- und des Septinzytoskeletts nach CDT-Behandlung wurden Zellen mit Septin 6-GFP und *lifeact-mCherry*, einem F-Aktin-Marker (Riedl *et al.*, 2008), cotransfiziert und mit CDT behandelt (Abbildung 55A-C). Anschließend wurde die Fluoreszenz für 120 min aufgenommen. Die Messung der Fluoreszenzintensitäten am zellulären Kortex zeigte nach 45 min die deutliche Abnahme der Aktinfluoreszenz bis auf den Wert der Hintergrundfluoreszenz nach 90 min. Die Septinfluoreszenz am Kortex blieb konstant bei diesen Untersuchungen. Die Messung der relativen Ausläuferbildung in den so behandelten Zellen zeigte die deutlichste Zunahme der Ausläufer zwischen 60 und 90 min nach Beginn der CDT-Behandlung. In durchgeführten ADP-Nachribosylierungsexperimenten mit CDT-behandelten Caco-2-Zellen zeigte sich eine Signalintensität von weniger als 10 % des Kontrollwerts nach je 60 und 90 min CDT-Behandlung (Abbildung 55D). So wiesen die durchgeführten kinetischen Untersuchungen auf eine Unabhängigkeit der Ausläuferbildung von F-Aktin hin. Zusätzlich wurde in fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen mit Phalloidin-Tetramethylrhodamin die Anwesenheit von F-Aktin in den CDT-induzierten Ausläufern ausgeschlossen. Die konstante Fluoreszenz von Septin 6-GFP am Zellkortex der Caco-2-Zellen, welche über 120 min nach der Behandlung mit CDT messbar war, zeigt die Anwesenheit von Septinfilamenten während der Ausläuferbildung am zellulären Kortex.

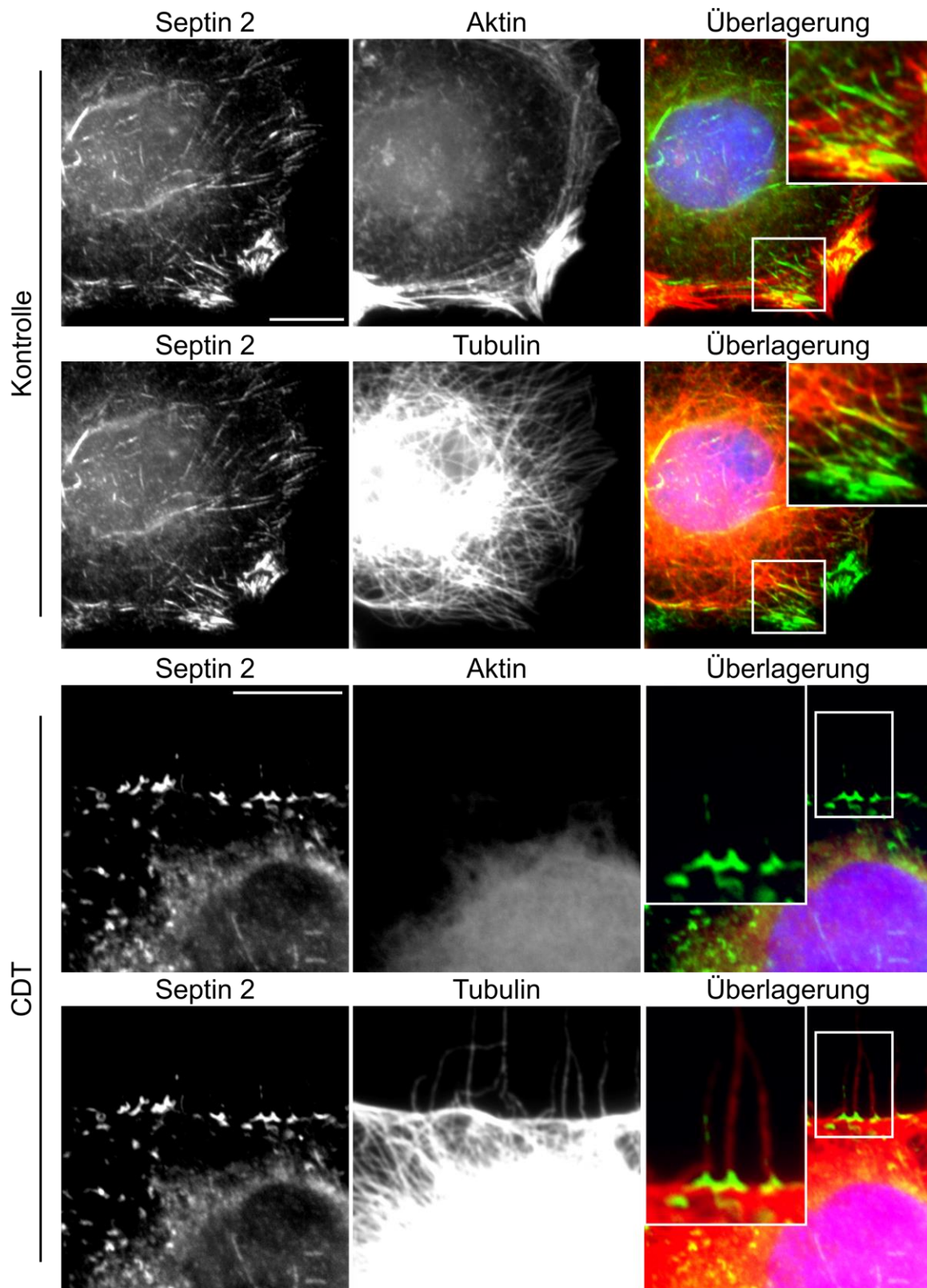


Abbildung 54: Mikrotubuli und Septine bilden die zytoskelettale Grundlage CDT-induzierter zellulärer Ausläufer in Caco-2-Zellen. Epifluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von Caco-2-Zellen, die für 120 min mit CDT behandelt wurden (200 ng/ml CDTa, 400 ng/ml CDTb) oder unbehandelt blieben (Kontrolle). Immunzytochemisch sind das Mikrotubuli- und Septinzytoskelett sichtbar gemacht, das Aktinzytoskelett wurde mit Phalloidin-Tetramethylrhodamin fluorescent markiert. In den überlagerten Bildausschnitten ist zusätzlich der durch DAPI markierte Zellkern (blau) dargestellt. Die Bildausschnitte der Kontrollzellen sowie der CDT-behandelten Zellen zeigen jeweils die Fluoreszenz derselben Zelle. Die vergrößerten und eingesetzten Ausschnitte zeigen jeweils die Fluoreszenz am zellulären Kortex bzw. CDT-induzierter Ausläufer. Die Kalibrierungsbalken entsprechen 10 μm.

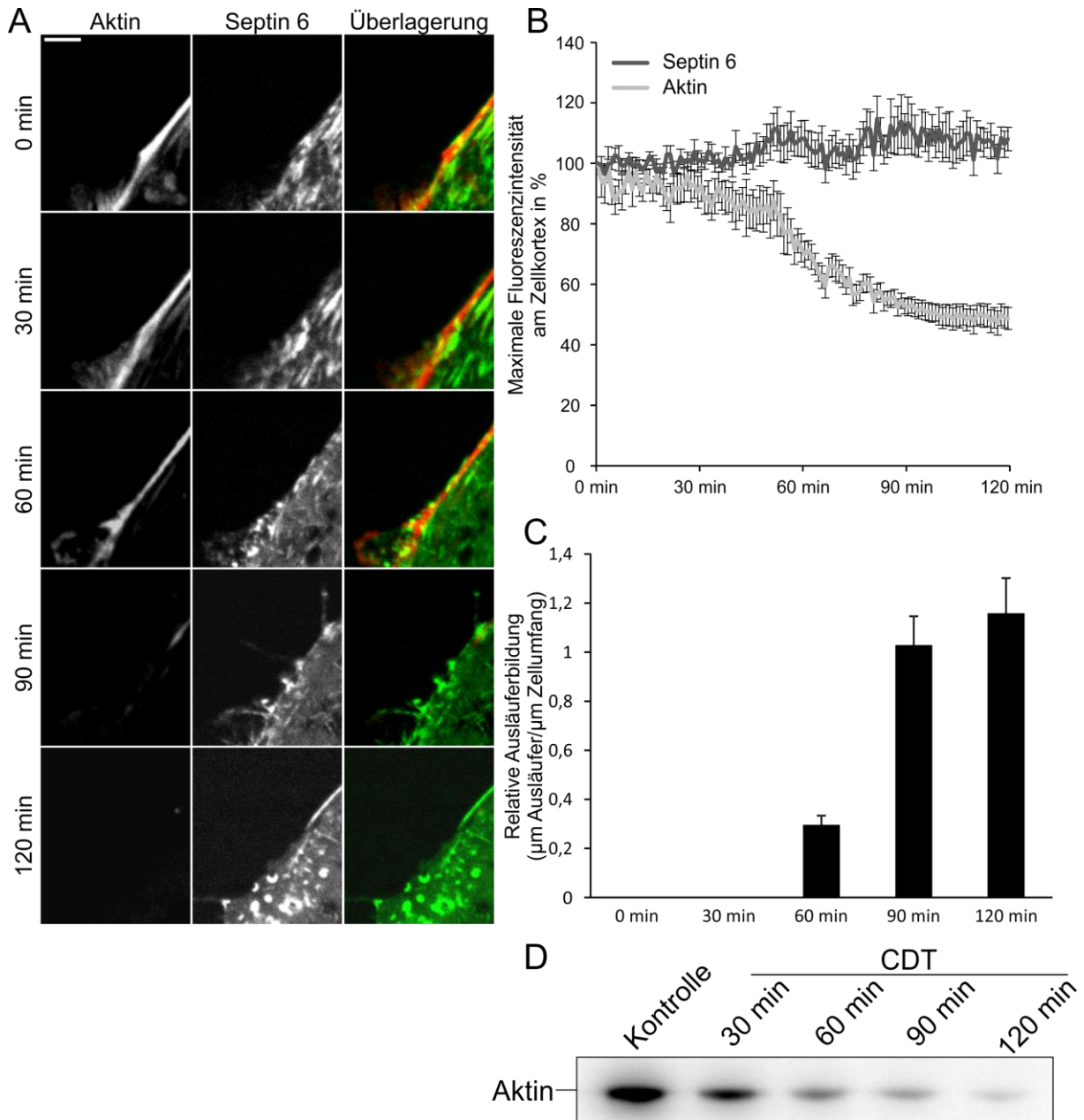


Abbildung 55: F-Aktin-Unabhängigkeit der CDT-induzierten Zellausläufer in Caco-2-Zellen. (A) Ausschnitte aus konfokalen fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen lebender Caco-2-Zellen. Die Caco-2-Zellen wurden mit Septin 6-GFP und *lifeact*-mCherry für 24 h transfiziert und mit CDT-behandelt (200 ng/ml CDTa, 400 ng/ml CDTb). Anschließend wurde die Fluoreszenz für 120 min aufgenommen. Für jeden Bildausschnitt ist die Dauer der CDT-Behandlung angegeben. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der Fluoreszenz am Zellkortex zu den angegebenen Zeitpunkten. Der Kalibrationsbalken entspricht 5 μm . (B) Darstellung der maximalen Intensität der Septin 6-GFP- und *lifeact*-mCherry-Fluoreszenz am zellulären Kortex aus den unter A beschriebenen Experimenten. Hierfür wurde die Fluoreszenzintensität von Caco-2-Zellen über 120 min nach CDT-Behandlung gemessen, dargestellt als % vom Ausgangswert. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler der Mittelwerte aus Messungen von 9 Zellen an. (C) Quantifizierung der Ausläuferbildung. Dargestellt ist die relative Ausläuferbildung (μm Ausläufer/ μm Zellumfang) der unter A und B beschriebenen Caco-2-Zellen. Die Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an. (D) Dargestellt ist ein repräsentatives Autoradiogramm eines ADP-Nachribosylierungsexperiments. Caco-2-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit CDT behandelt (100 ng/ml CDTa, 200 ng/ml CDTb) oder blieben unbehandelt (Kontrolle). Die so behandelten Zellen wurden lysiert, unmodifiziertes G-Aktin in den Zelllysaten in Gegenwart von [^{32}P]NAD durch C2I „nachribosyliert“ und die Lysate durch SDS-PAGE aufgetrennt. Das Acrylamidgel wurde in einem Phosphorimager ausgelesen.

5. DISKUSSION

Die Aktin-ADP-Ribosyltransferase CDT von *C. difficile* führt zur Bildung von Zellprotrusionen in intestinalen Epithelzellen, die eine erhöhte Pathogenadhäsion bewirken. Die Protrusionen enthalten Mikrotubuli und ihre Entstehung beruht auf der Depolymerisation des kortikalen Aktinzytoskeletts. Während die Dynamik der Mikrotubuli unter dem Einfluss von CDT bereits eingehend beschrieben wurde (Schwan *et al.*, 2009), sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob die Zusammensetzung der Plasmamembran die Toxin-induzierte Ausläuferbildung beeinflusst. Weiterhin sollte die Rolle von Septinen, die als vierte Komponente des Zytoskeletts aufgefasst werden, bei der Bildung der Zellausläufer untersucht werden.

5.1. Untersuchungen zum Einfluss der Plasmamembranzusammensetzung auf die CDT-induzierte Ausläuferbildung

5.1.1. CDT induziert Mikrotubuli-basierte zelluläre Ausläufer durch Aktin-ADP-Ribosylierung

Wie in Abschnitt 4.1.1 beschrieben, werden die Mikrotubuli-basierten zellulären Ausläufer, die durch CDT induziert werden, durch die Depolymerisation des Aktinzytoskeletts hervorgerufen. Eine Ausläuferbildung in Caco-2-Zellen konnte durch die Behandlung mit CDT, C2-Toxin sowie durch die Mikroinjektion von CDTa induziert werden. Da auch die Mikroinjektion der enzymatisch aktiven Komponente CDTa zur Bildung zellulärer Ausläufer führte, konnte ausgeschlossen werden, dass eine Bindung von CDTb an die Zelloberfläche eine derartige Ausläuferbildung auslöst oder mitbeeinflusst. Dies ist entscheidend, da der Einfluss der Membrankonstitution auf die Ausläuferbildung weiter untersucht werden sollte. Eine verformende Membranaktivität durch die Bindung bakterieller Toxine konnte zum Beispiel für das Shiga-Toxin von *Shigella dysenteriae* beobachtet werden, welches durch die multivalente Bindung von Glykolipiden an der Zelloberfläche lange tubuläre Membraninvaginationen induziert. Diese spielen eine Rolle bei der Aufnahme des Toxins (Römer *et al.*, 2007). Dieser Prozess beinhaltet unter anderem die durch die Bindekomponente des Shiga-Toxins induzierte Aggregation von Globotriaosylceramid in der Plasmamembran, was eine Verformung der Plasmamembran bewirkt. Eine Aggregation von Glykolipiden wurde ebenfalls bei der Bindung von Cholera-Toxin beobachtet (Hammond *et al.*, 2005).

5.1.2. Die Cholesteroldepletion der Plasmamembran hemmt die Bildung CDT-induzierter Zellausläufer

Um die Funktion der Plasmamembran und ihrer Zusammensetzung bei der Bildung CDT-induzierter Zellausläufer zu untersuchen, wurden Experimente mit der Cholesterol-depletierenden Substanz Methyl- β -Cyclodextrin durchgeführt (Prydz and Simons, 2001). Methyl- β -Cyclodextrin ist ein zyklisches Oligosaccharid, welches Cholesterol in seiner Struktur komplexiert und es direkt aus der Plasmamembran extrahiert. Es wirkt lösungsvermittelnd auf Cholesterol, eine Eigenschaft, die man sich auch für die Anreicherung der Plasmamembran mit Cholesterol in Zellkulturen zunutze machen kann (Christian *et al.*, 1997). Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen, bei denen das Membrancholesterol mit Filipin angefärbt wurde (Gimpl and Gehrig-Burger, 2007), zeigten eine konzentrationsabhängige Reduktion des Membrancholesterols durch Methyl- β -Cyclodextrin in Caco-2-Zellen. Eine Behandlung mit 5 mM Methyl- β -Cyclodextrin führte zu einer circa 60 %igen Reduktion der Filipinfluoreszenz der Plasmamembran. In dieser Konzentration hatte Methyl- β -Cyclodextrin eine Hemmung der CDT-induzierten relativen Ausläuferbildung (μm Ausläufer/ μm Zellumfang) um etwa 80 % zur Folge.

Diese Untersuchungen lassen vermuten, dass der Cholesterolgehalt der Plasmamembran eine entscheidende Rolle bei der Bildung von zellulären Ausläufern spielt, wahrscheinlich sind hierfür Veränderungen der biophysikalischen Eigenschaften der Plasmamembran verantwortlich. Die Extraktion des Cholesterols führt zu einer Versteifung und Schrumpfung der Membran und dadurch vermutlich zu einer Erhöhung des Kraftaufwands, der für die Bildung zellulärer Protrusionen benötigt wird (Khatibzadeh *et al.*, 2013). Eine essenzielle Funktion des Membrancholesterols wurde schon für die Bildung von verschiedenen, hauptsächlich auf Aktin basierenden Zellprotrusionen beschrieben (Larive *et al.*, 2010; Caldieri and Buccione, 2010; Niggli *et al.*, 2004). Dabei scheint die strukturelle Komponente der Protrusionen (Mikrotubuli oder F-Aktin) eine nachgeordnete Rolle zu spielen. Durch die Cholesteroldepletion der verwendeten Caco-2-Zellen wurde maßgeblich die Anzahl und weniger die Länge der gebildeten Ausläufer reduziert, was dafür spricht, dass Cholesterol für die Initiation der Ausläuferbildung benötigt wird und weniger für das Wachstum oder die Stabilität der CDT-induzierten Zellausläufer. Dies lässt ebenfalls vermuten, dass Cholesterol die Initiation der CDT-induzierten Zellausläufer biophysikalisch begünstigt, zum Beispiel durch die Förderung von Membranausstülpungen.

In Cholesterol-depletierten Zellen war nach 90-minütiger CDT-Behandlung eine zunehmende Ansammlung gekrümmter Mikrotubuli am Zellkortex zu beobachten und eine signifikante Zunahme der subkortikalen Mikrotubulifluoreszenz messbar. Diese Befunde deuten auf eine erhöhte Barrierefunktion der Cholesterol-depletierten Plasmamembran hin. Cholesterol stellt auch einen Hauptbestandteil von *lipid rafts* dar. Diese Cholesterol- und Sphingolipid-reichen Membrandomänen werden häufig in funktionellen Zusammenhang mit Kurvaturen, Protrusionen und Teilungen der Plasmamembran gebracht (Huttner and Zimmerberg, 2001). Nach der Rekonstitution des Membrancholesterols von Cholesterol-depletierten und CDT-behandelten Zellen wurde eine prompte und vermehrte Bildung zellulärer Ausläufer beobachtet. Diese verlief im Vergleich zu den Kontrollzellen etwa doppelt so schnell. Hier wirkte die Rekonstitution des Membrancholesterols wie ein Schalter auf die Ausläuferbildung, was die entscheidende Rolle des Cholesterols bei diesem Prozess zusätzlich unterstreicht.

5.1.3. Die Cholesteroldepletion hat keinen maßgeblichen Einfluss auf die CDT-Aktivität und die Aufnahme von CDT

Die Hemmung der CDT-induzierten Ausläuferbildung durch die Cholesteroldepletion mittels Methyl- β -Cyclodextrin könnte neben einem direkten Effekt auf die Ausläuferbildung auch von einer Wirkung auf die CDT-Aufnahme und die Toxin-Aktivität hervorgerufen werden. Um auszuschließen, dass unter den hier gegebenen Bedingungen die Cholesteroldepletion die Aufnahme von CDT hemmt, wurden fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Toxinaufnahme mit Fluorophor-gekoppeltem CDTa durchgeführt. Ein hemmender Einfluss von Methyl- β -Cyclodextrin ließ sich nicht beobachten.

In ADP-Nachribosylierungsexperimenten, die mit Lysaten von Cholesterol-depletierten Zellen durchgeführt wurden, konnte kein wesentlicher Effekt von Methyl- β -Cyclodextrin auf die Aktin-ADP-Ribosylierung durch CDT festgestellt werden. Nach 60-minütiger Toxin-Behandlung ließ sich eine nur geringe Verzögerung der Vergiftung durch die Cholesteroldepletion nachweisen. Der Beginn der Toxin-induzierten Ausläuferbildung nach Cholesteroldepletion war ebenfalls verzögert (circa 15 min später als in Kontrollzellen). Hier könnte die Rolle des Cholesterols bei Endozytoseprozessen zum Tragen kommen (Nichols and Lippincott-Schwartz, 2001) oder eine Funktion des Cholesterols bei der Porenbildung von CDT, so wie es unter anderem für verschiedene porenbildende bakterielle Toxine beschrieben wurde (Tweten, 2005; Popoff, 2014).

Ein Effekt auf die Aktivität von CDTa durch Methyl- β -Cyclodextrin in ADP-Ribosylierungsexperimenten mit aufgereinigtem Aktin konnte nicht beobachtet werden. In fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen des Aktinzytoskeletts war ebenfalls keine Wirkung der Cholesteroldepletion zu beobachten, weder in unbehandelten Zellen noch nach 90-minütiger CDT-Behandlung. Die Hemmung der Ausläuferbildung durch die Behandlung mit Methyl- β -Cyclodextrin nach erfolgter CDT-Aufnahme deutet ebenfalls auf eine spezifische Funktion des Cholesterols bei der Ausläuferbildung hin.

5.1.4. Substanzen, die die Bildung und das Gefüge von *lipid rafts* stören, hemmen die Bildung CDT-induzierter Zellausläufer

Zur Untersuchung der Rolle von *lipid rafts* bei der Bildung CDT-induzierter Ausläufer wurden Substanzen wie Sphingomyelinase, Myriocin, Nystatin oder Benzylalkohol verwendet, welche gezielt den Membrangehalt von Sphingolipiden oder Sphingomyelin senken oder das Gefüge von *lipid rafts* stören (Matsuda *et al.*, 2010; Poole *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2014; Bolard, 1986; Nagy *et al.*, 2007). Der hemmende Einfluss der verschiedenen Substanzen auf die CDT-induzierte Ausläuferbildung in Caco-2-Zellen war in etwa gleich stark. Es waren circa 75 % weniger Ausläufer nach 120-minütiger CDT-Behandlung messbar.

Lipid rafts haben eine Funktion bei verschiedenen Endozytoseprozessen und der Porenbildung verschiedener bakterieller Toxine. So könnte die hemmende Wirkung dieser Substanzen auf die CDT-induzierte Ausläuferbildung ebenfalls durch die Hemmung der Toxinaufnahme hervorgerufen werden. Um dies auszuschließen, wurde Benzylalkohol, der direkt mit den Cholesterol- und Sphingolipid-reichen Membrandomänen interagiert und deren Gefüge stört, erst nach Beginn der Ausläuferbildung angewendet, wodurch diese stagnierte. Außerdem zeigte sich bei den durchgeführten ADP-Nachribosylierungsexperimenten kein Einfluss der Vorbehandlung mit Sphingomyelinase auf die Aufnahme von CDT und die Aktin-ADP-Ribosylierung in Caco-2-Zellen. Das verwendete Polyen-Antibiotikum Nystatin bindet direkt an Cholesterol und sequestriert dieses in der Plasmamembran. Die Hemmung der Ausläuferbildung durch diese Substanz deutet darauf hin, dass nicht unbedingt der Cholesterolgehalt der Plasmamembran für die Ausläuferbildung essenziell ist, sondern dessen funktionelle Verfügbarkeit.

Die Depletion von Cholesterol aus der Plasmamembran bewirkt, wie in Abschnitt 5.1.2 erwähnt, das Schrumpfen und die Reduktion der Fluidität der Plasmamembran. Benzylalkohol, der neben der Störung des Gefüges von *lipid rafts* auch eine Erhöhung der Membranfluidität bewirkt (Nagy *et al.*, 2007), hatte ebenfalls eine hemmende Wirkung auf

die Ausläuferbildung. So scheinen die möglichen Einflüsse der verschiedenen Substanzen auf die Fluidität der Membran bei der Bildung CDT-induzierter Zellausläufer zweitrangig zu sein. Erwähnenswert ist auch, dass die untersuchten Zellen nach CDT-Behandlung typische morphologische Anzeichen einer CDT-Wirkung zeigten. So spricht die hemmende Wirkung der verwendeten Substanzen auf die CDT-induzierte Ausläuferbildung für eine Beteiligung von *lipid rafts* an diesem Prozess.

5.1.5. Untersuchungen zur zytotoxischen Wirkung der verwendeten Substanzen

Potenziell zytotoxische Wirkungen der verwendeten Substanzen, deren Einfluss auf die CDT-induzierte Ausläuferbildung in Caco-2-Zellen untersucht wurde, begründen sich darin, dass sie die Membranfunktion der Zellen beeinträchtigen. Für Nystatin, welches durch die Ergosterol-abhängige Porenbildung in der Plasmamembran von Pilzzellen antimykotisch wirkt (Helrich et al., 2006), ist bekannt, dass es in hohen Konzentrationen auch eine Porenbildung in der Plasmamembran von Säugetierzellen verursacht (Semis *et al.*, 2013). Eine toxische Wirkung der Substanzen könnte die Energieversorgung der Zellen einschränken, was energieabhängige Endozytosemechanismen oder die Polymerisation von Mikrotubuli hemmen könnte und so die Bildung CDT-induzierter Zellausläufer beeinflussen würde. Außerdem zeigen Zellen, die in ihrer Viabilität beeinträchtigt sind, Veränderungen in ihrer Membranzusammensetzung, was die Ausläuferbildung beeinflussen könnte. Beschrieben ist vor allem die Anreicherung von Phosphatidylserin in der äußeren Schicht der Plasmamembran nach Induktion von Apoptosemechanismen (Segawa *et al.*, 2014).

Bei den durchgeführten Untersuchungen wurden die Substanzen in den gleichen Konzentrationen und für die gleiche Dauer wie in den übrigen Experimenten angewendet. Es zeigte sich weder ein wesentlicher Einfluss auf die Morphologie der Zellen noch auf die Zellviabilität. Die für die Untersuchung der Zellviabilität durchgeführten fluoreszenzbasierten Messungen begründen sich in der Umsetzung des Farbstoffs Resazurin in ein fluoreszentes Produkt, was hauptsächlich in den Mitochondrien der Zellen geschieht. Eine Umsetzung spricht also für einen intakten Metabolismus der Zellen. Für Untersuchungen zur Induktion von Apoptosemechanismen durch die verwendeten Substanzen könnte man weitere spezifischere Experimente durchführen wie zum Beispiel die Analyse der PARP-Spaltung (Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase) (D'Amours *et al.*, 2001) oder eine TUNEL-Färbung (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*) (Gavrieli *et al.*, 1992).

5.1.6. Anreicherung von *lipid raft*-Markern an Stellen der CDT-induzierten Ausläuferbildung

In fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigte sich eine Anreicherung von *lipid raft*-Markern entlang des Schafts CDT-induzierter zellulärer Ausläufer. Zusätzlich war eine Anreicherung an den Spitzen der Protrusionen zu beobachten. Diese Beobachtung wurden für das Gangliosid GM1 sowie für das Membranprotein Flotillin 2 gemacht. Beide sind bekannt dafür sich in Cholesterol- und Sphingolipid-reichen Membrandomänen anzureichern (Harder *et al.*, 1998; Solomon *et al.*, 2002).

Entlang verschiedener zellulärer Protrusionen ließen sich bisher Anreicherungen von *lipid raft*-Markern beobachten (Larive *et al.*, 2010; Janich and Corbeil, 2007; Grundner and Zemljic Jokhadar, 2014). Für Flotillin 2-reiche Membrandomänen, die sich an der Spitze wachsender Axone konzentrieren, wird Folgendes angenommen: Sie dienen als Signalplattformen, die unter anderem den Nachschub an Membranen für das Axonwachstum von Neuronen über den Vesikeltransport regulieren. Ebenfalls sollen Vesikel, die reich an Membranproteinen für die Zell-Zell- oder die Zell-Matrix-Interaktion sind, durch diese Signalplattformen in die Axone geleitet werden (Stuermer, 2010). Für die CDT-induzierten Zellausläufer ist beschrieben, dass sich besonders Rab11-positive Vesikel in den Ausläufern befinden, die das Zell-Zell-Verbindungsprotein Integrin sowie das extrazelluläre Matrixprotein Fibronectin enthalten. Diese Befunde sind anscheinend für eine vermehrte Adhäsion von *C. difficile* von Bedeutung (Schwan *et al.*, 2014).

Die Ganglioside und *lipid raft*-Marker GM1 und GM3 reichern sich unterschiedlich in verschiedenen Protrusionen an. Während GM1 sich in Membranen von Aktin-basierten Mikrovilli und Mikrotubuli-basierten Zilien anreichert, findet sich GM3 ausschließlich vermehrt in Membranen von Zilien (Janich and Corbeil, 2007). Bei den hier durchgeführten Untersuchungen zeigte sich zudem eine Anreicherung von GM1 an der Spitze der CDT-induzierten Zellausläufer und an Stellen der Ausläuferbildung. Hier würden Untersuchungen von *lipid raft*-Proteinen helfen, die als GFP-Konstrukte transfiziert werden können, die Dynamik dieser Prozesse näher zu beleuchten (Riento *et al.*, 2009). Durch die Substanz Laurdan lassen sich Cholesterol-reiche Membrandomänen lebender Zellen ebenfalls fluoreszenzmikroskopisch untersuchen (Bagatolli, 2006).

Vielleicht formt sich im Bereich der CDT-induzierten Zellausläufer auch eine Makrodomäne, so wie es für das primäre Zilium beschrieben wurde, welches ebenfalls eine Mikrotubuli-basierte zelluläre Protrusion darstellt (Hu et al., 2010). Dafür spricht insbesondere die Anreicherung der *lipid raft*-Marker entlang der CDT-induzierten Zellausläufer. Überdies wird diese Vermutung dadurch unterstützt, dass das kortikale Aktinzytoskelett über verschiedene Aktin-assoziierte Proteine *lipid rafts* separiert und organisiert. Ohne kortikales Aktin kommt es zu einem Zusammenfließen verschiedener *lipid rafts* zu größeren Membrandomänen (Viola and Gupta, 2007). Möglich wäre ebenfalls, dass *lipid rafts* für die initiale Ausstülpung der Plasmamembran wichtig sind, da sie unter anderem durch die Assoziation mit BAR-Proteinen Membrankurvaturen induzieren können (Cao et al., 2012). Die Beobachtung, dass sich die Cholesteroldepletion in erster Linie auf die Anzahl der gebildeten Zellausläufer nach CDT-Behandlung und nicht auf ihre Länge auswirkt, unterstützt eine solche Hypothese, da dieser Befund für eine Hemmung der Initiation der Ausläuferbildung durch Methyl- β -Cyclodextrin spricht.

Darüber hinaus ist eine Interaktion von Mikrotubuli oder Mikrotubuli-assoziierten Proteinen mit *lipid rafts* bei der Ausläuferbildung denkbar. Eine Funktion wurde hier für die Rezeptor-Tyrosinkinase TrkA entdeckt, die Mikrotubuli direkt zu *lipid rafts* dirigiert und dadurch wahrscheinlich das Axonwachstum reguliert (Pryor et al., 2012). Möglicherweise spielen Cholesterol- und Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat-reiche Membrandomänen eine Rolle, die Mikrotubuli an der Membran verankern und stabilisieren können (Golub and Caroni, 2005). Zum Verständnis der Interaktion des Zytoskeletts mit Cholesterol- und Sphingolipid-reichen Membrandomänen bei der Bildung CDT-induzierter Ausläufer bedarf es weiterer spezifischer Untersuchungen.

Die physiologische Funktion von Cholesterol- und Sphingolipid-reichen Membrandomänen im Darm von Säugetieren besteht unter anderem im Schutz der Enterozyten vor der Zersetzung durch Gallensalze, da *lipid rafts* besonders resistent gegenüber Detergenzien sind (Cao et al., 2012). Daher rührt ihre alternative Bezeichnung als *detergent resistant membrane fraction*. Apikale Enterozytenmembranen sind daher besonders reich an Cholesterol und Sphingolipiden. Hier bilden sich die CDT-induzierten Zellausläufer und findet die Wirt-Pathogen-Interaktion statt (Schwan et al., 2009). So könnten die *lipid rafts* der apikalen Plasmamembran der Enterozyten die Bildung CDT-induzierter Zellausläufer im Darm begünstigen und dadurch die Pathogenadhäsion verstärken.

5.2. Die Rolle des Septinzytoskeletts bei der Bildung CDT-induzierter Zellausläufer

5.2.1. Die Lokalisation spezifischer Septinstrukturen an der Basis CDT-induzierter Zellausläufer

Bei fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen CDT-behandelter Caco-2-Zellen war zu beobachten, dass CDT neben der Depolymerisation des Aktinzytoskeletts zu einer Umorganisation des Septinzytoskeletts führte. Durch die CDT-Behandlung verschwanden die sonst langen und geraden Septinfilamente der Zellen. Es bildeten sich kürzere und gebogene Filamente sowie Septinringe. Ein funktioneller Zusammenhang zwischen dem Septin- und dem Aktinzytoskelett ist bereits mehrfach beobachtet worden (Kinoshita *et al.*, 2002; Schmidt and Nichols, 2004). Allerdings sind die molekularen Grundlagen dieser Interaktion noch unklar (Spiliotis and Nelson, 2006; Spiliotis and Gladfelter, 2012). Vermutlich dienen Septinfilamente als molekulares Gerüst, das durch die Bindung von Proteinen wie Myosin II und Annilin sowie von Rho-Kinasen die Polymerisation von F-Aktin fördert. So wird auch der Verlust von Aktinstressfasern durch Septindepletion auf eine Reduktion der Myosin II-Phosphorylierung zurückgeführt (Kinoshita *et al.*, 2002; Joo *et al.*, 2007).

Nach Behandlung verschiedener kolorektaler Karzinomzelllinien mit CDT zeigten sich in konfokalen fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen trichterförmige Septinstrukturen an der Basis CDT-induzierter Zellausläufer. Durch Immunfluoreszenz konnte gezeigt werden, dass sich die Septine 2, 6 und 7 an der Bildung dieser Strukturen in Caco-2-Zellen beteiligen. Diese drei Septine werden ubiquitär exprimiert und bilden heterotrimere Hexamere, von denen man annimmt, dass sie als Grundbaustein für den Aufbau höher organisierter Septinstrukturen dienen (Mostowy and Cossart, 2012).

Bei verschiedenen zellulären Protrusionen unterschiedlicher Zelltypen und Organismen konnte bereits eine Lokalisation von Septinfilamenten an deren Basis beobachtet werden (Hu *et al.*, 2012; Dagdas *et al.*, 2012). Die Septine wurden jeweils als strukturelle Komponente der Protrusionen identifiziert. Besonders gut untersucht ist die Rolle des Septinzytoskeletts bei der Ausläuferbildung in verschiedenen Pilzarten wie *Ashbya gossypii*, *Candida albicans* oder *Cryptococcus neoformans* (Spiliotis and Gladfelter, 2012). An der Basis primärer Zilien konnte die Lokalisation eines Septinrings gezeigt werden, der dort an dem Aufbau einer Diffusionsbarriere beteiligt ist. Weiterhin sind Septine an der Basis von Kinozilien humaner Zellen der oberen Atemwege lokalisiert (Fliegau *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2010).

3D-Rekonstruktionen der Septinstrukturen an der Basis CDT-induzierter Zellausläufer auf der apikalen Seite von Caco-2-Zellen ließen trichterförmige Septinstrukturen erkennbar werden, die sich manschettenartig um die Mikrotubuli an der Ausläuferbasis legten. Die Septinstrukturen waren offenbar hohl und ermöglichten die Polymerisation von Mikrotubuli in die Protrusionen hinein. Der genaue molekulare Aufbau dieser Septinstrukturen ist nicht klar. Trichterförmige Strukturen könnten sich zum Beispiel durch Aneinanderlagerung von Septinringen bilden, deren Durchmesser sich zur Spitze der Ausläufer hin verjüngen. Ähnliche Septinstrukturen wurden auch in der Teilungsfurche von Hefezellen beobachtet. Hier zeigten elektronenmikroskopische Aufnahmen sanduhrförmige Septinstrukturen, aufgebaut aus parallelen Septinringen, deren Durchmesser sich zur Teilungsfurche hin verjüngte (Oh and Bi, 2011).

Videomikroskopische Untersuchungen CDT-induzierter Ausläufer zeigten, dass die Septinstrukturen über den Zeitraum des Bestehens der Ausläufer stabil an der Basis assoziiert blieben und sich mit den beweglichen Ausläufern ausrichteten. Allgemein zeigen Septinfilamente eine weniger ausgeprägte Dynamik und einen 3- bis 4-fach geringeren Turnover als Aktin- und Mikrotubulifilamente (Hagiwara *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2008). Dieses spricht ebenfalls für die Ausbildung beständiger Septinstrukturen an der Basis CDT-induzierter Zellausläufer.

Die Beobachtung, dass sich diese spezifischen Septinstrukturen zum einen an der Basis CDT-induzierter Zellausläufer verschiedener kolorektaler Karzinomzelllinien ausbildeten und sich vergleichbare Septinstrukturen zum anderen auch an der Basis von Dendritenverzweigungen in Neuronen zeigen (Hu *et al.*, 2012), deutet auf eine generelle Bedeutung dieser Septinstrukturen bei der Bildung zellulärer Protrusionen hin.

5.2.2. CDT-induzierte Zellausläufer bilden sich an Stellen der Plasmamembran, an denen sich Septinakkumulationen befinden

Um die Septindynamik an der Plasmamembran während der Ausläuferbildung zu untersuchen, wurden verschiedene Septin-GFP-Konstrukte in Caco-2-Zellen transfiziert und die Septindynamik während der Ausläuferbildung aufgenommen. Dies wurde durchgeführt mit den dafür klonierten GFP-Konstrukten der Septine 2, 6 und 7, deren endogene Beteiligung an der CDT-induzierten Ausläuferbildung in Caco-2-Zellen bereits immunfluoreszenzmikroskopisch bestätigt wurde. In Caco-2-Zellen war nach der Transfektion der einzelnen Septine ein fluoreszentes filamentöses Netzwerk zu beobachten, das die typische Morphologie des Septinzytoskeletts aufwies. Ein sichtbarer Unterschied

zwischen den verschiedenen Septin-GFP-Konstrukten konnte nicht festgestellt werden. Die Fluoreszenz der unterschiedlichen Septin-GFP-Fusionsproteine konnte auch an der Basis der CDT-induzierten Zellausläufer beobachtet werden. Interessanterweise war bei diesen Experimenten festzustellen, dass die CDT-induzierte Ausläuferbildung an Stellen der Plasmamembran stattfand, an denen bereits zuvor Septinakkumulationen zu beobachten waren. Dies konnte separat für die Septine 2, 6 und 7 verfolgt werden. Hierbei formten sich die typischen Septinstrukturen. Septine könnten hier als Schnittstelle zwischen der Plasmamembran und den Mikrotubuli fungieren, denn für beide Strukturen sind direkte Interaktionen mit Septinen nachgewiesen worden (Bai *et al.*, 2013; Spiliotis and Gladfelter, 2012). Die Entwicklung von Septinakkumulationen an der Plasmamembran zu zellulären Protrusionen wurde schon in anderen Zelltypen und Organismen beobachtet (Hu *et al.*, 2012; Ford and Pringle, 1991; Kim *et al.*, 1991).

Bestehende Ergebnisse aus Untersuchungen zur Bindung von Septinen an Plasmamembranlipide zeigen eine Interaktion mit Phosphatidylinositolen durch die polybasische Region der Septine (Zhang *et al.*, 1999; Casamayor and Snyder, 2003). Eigene Untersuchungen mit *membrane lipid strips* und den rekombinanten Septinen 2, 6, und 7 bestätigten dies. Hier war festzustellen, dass Septin 6 als einziges der drei Septine eine starke Bindung an Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat (PIP3) zeigte. Gemeinsam waren den drei Septinen eine Bindung an Phosphatidsäure, Phosphatidylinositol-4-phosphat (PI4P) und Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat (PIP2) (Abbildung 58 im Anhang). PIP2 und PIP3 sind Phosphoinositide, die in der Plasmamembran zu finden sind, PI4P dagegen in den Membranen des Golgi-Apparats und des Endoplasmatischen Retikulums (Simonsen *et al.*, 2001; Cantley, 2002). Auf die Plasmamembran haben Septine verformende und versteifende Einflüsse (Spiliotis and Gladfelter, 2012). So ist es möglich, dass die Septinstrukturen an der Ausläuferbasis die auf die Plasmamembran wirkenden Kräfte durch die protrusive Aktivität der Mikrotubuli dirigieren, eventuell abpuffern und die Membran dort stabilisieren.

Wie in der vorliegenden Arbeit näher untersucht wurde, spielt die Lipidzusammensetzung der Plasmamembran und die Bildung von *lipid rafts* eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der CDT-induzierten Zellausläufer. Die Bildung der Septinstrukturen an der Basis der Zellausläufer könnte von diesen Membrandomänen abhängig sein. Dafür spricht, dass Septine in verschiedenen Organismen in *lipid rafts* nachweisbar und an der Bildung der Membrandomänen beteiligt sind (Martin and Konopka, 2004; Takeda *et al.*, 2004; Maimaitiyiming *et al.*, 2008). Um genauere Aussagen über den Zusammenhang von Septinen und *lipid rafts* bei der Bildung CDT-induzierter Zellausläufer zu treffen, sind weitere

Untersuchungen nötig. Fluoreszenzmikroskopische Studien der Plasmamembran an der Basis CDT-induzierter Ausläufer und am Ort ihrer Entstehung sowie Untersuchungen zum Einfluss der Cholesteroldepletion auf das Septinzytoskelett würden möglicherweise wichtige Hinweise liefern. Ebenfalls könnte eine Anreicherung von Septinen in isolierten *detergent resistant membrane fractions* durch die Behandlung von Zellen mit CDT einen Bezug zwischen den Funktionen von *lipid rafts* und Septinen bei der Toxin-induzierten Ausläuferbildung herstellen.

An die Plasmamembran gebunden, besitzen Septinfilamente ein hohes Membran-verformendes Potenzial. In Studien mit Phosphatidylinositol-reichen GUVs (*giant unilamellar vesicles*) war eine starke Membranaktivität der Septine zu beobachten. Die Bildung langer tubulärer Membranausstülpungen wurde induziert, um die sich manschettenartig Septinringe legten (Tanaka-Takiguchi *et al.*, 2009). Dieses Potenzial der Septine ist möglicherweise für die Initiation der CDT-induzierten Ausläuferbildung von Bedeutung, da es dabei helfen könnte, die Energie für die Ausstülpung der Plasmamembran aufzubringen. Womöglich ist hierfür zusätzlich ein Zusammenspiel mit der Polymerisation der Mikrotubuli vonnöten, um die Barriere der Plasmamembran zu überwinden.

Jüngere Untersuchungen zeigten, dass sich höher geordnete Septinstrukturen an der Plasmamembran durch laterale Diffusion und die Zusammenlagerung kleinerer Untereinheiten formen (Bridges *et al.*, 2014). Hierbei könnte die Zerstörung des kortikalen Aktinzytoskeletts durch CDT eine entscheidende Rolle spielen. Septinfilamente assoziieren mit dem kortikalen Aktinnetzwerk und bilden eine stabile Komponente des kortikalen Zytoskeletts (Hagiwara *et al.*, 2011; Gilden and Krummel, 2010). Die durchgeführten fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen von Caco-2-Zellen zeigten ebenfalls eine Anordnung von Septinfilamenten entlang des kortikalen Aktinzytoskeletts. Nach der Behandlung mit CDT kam es in Abwesenheit des Aktins zur Bildung der oben beschriebenen Septinstrukturen. In Verbindung mit dem bekannten Zusammenhang zwischen der Organisation des Septinzytoskeletts und der Integrität des Aktinzytoskeletts liegt die Vermutung nahe, dass sich mit zunehmender Depolymerisation des kortikalen Aktins die Septine an der Plasmamembran versammeln und dort Aktin-unabhängig zu größeren Komplexen polymerisieren.

5.2.3. Forchlorfenuron hemmt die Bildung CDT-induzierter Zellausläufer

Forchlorfenuron ist aktuell der einzig verfügbare Inhibitor der Septindynamik. Es wird weithin eingesetzt, um zellbiologische Funktionen des Septinzytoskeletts in verschiedenen

Zelltypen und Organismen zu studieren (DeMay *et al.*, 2010; Ghossoub *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2010; Hagiwara *et al.*, 2011). Eine Behandlung von Zellen mit Forchlorfenuron führt zur Ausbildung von langen und gebündelten Septinfilamenten. Dabei hat Forchlorfenuron einen stabilisierenden Einfluss auf die Septinfilamente durch die Reduzierung des Turnovers (Hu *et al.*, 2008). In diesem Zusammenhang sind Untersuchungen hervorzuheben, die zeigen, dass im Schimmelpilz *Ashbya gossypii* eine Umorganisation des Septinzytoskeletts durch Forchlorfenuronbehandlung induziert werden konnte. Hier bildeten sich lange und gerade Filamente aus anstatt der sonst vorhandenen Septinringe (DeMay *et al.*, 2010). Der Einfluss von Forchlorfenuron auf das Septinzytoskelett ist wahrscheinlich durch dessen Bindung in der Nukleotidbindetasche der Septine begründet (Angelis *et al.*, 2014).

Die Vorbehandlung von Caco-2-Zellen mit Forchlorfenuron führte zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der CDT-induzierten Ausläuferbildung. 100 μM Forchlorfenuron reduzierte die relative Ausläuferbildung (μm Ausläufer/ μm Zellumfang) um etwa 80 %. Hierbei wurden sowohl Länge als auch Anzahl der gebildeten Ausläufer gleichermaßen beeinflusst. Dies spricht für eine Funktion der Septine bei der Bildung und der Stabilisierung der CDT-induzierten Zellausläufer. Diese Hypothese wird durch die mikroskopischen Untersuchungen zur Septindynamik an der Basis CDT-induzierter Zellausläufer unterstützt. Zu Forchlorfenuron ist zu erwähnen, dass die hier verwendeten Konzentrationen und die Behandlungsdauer gleichermaßen bei Untersuchungen in anderen Zelllinien und Organismen eingesetzt wurden (DeMay *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2008), wobei auch 5 bis 10-mal höhere Konzentrationen keinen Einfluss auf die Zellviabilität hatten. Die hier verwendeten Caco-2-Zellen zeigten ebenfalls keine morphologischen Veränderungen durch die Forchlorfenuronbehandlung.

Septine spielen bei verschiedenen Endozytoseprozessen eine essenzielle Rolle. Dies wurde vor allem bei der Endozytose pathogener Mikroorganismen beobachtet (Phan *et al.*, 2013; Mostowy *et al.*, 2009a; Mostowy *et al.*, 2009b). Für das clostridiale Botulinum-Neurotoxin A (BoNT A) wurde eine direkte Interaktion mit Septinfilamenten beschrieben, die die Stabilität und Persistenz des Toxins in Zellen erhöhen soll (Vagin *et al.*, 2014). Um auszuschließen, dass die Behandlung mit Forchlorfenuron einen Einfluss auf die Aufnahme von CDT in Caco-2-Zellen hat, wurden fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen mit Fluorophor-gekoppeltem Toxin durchgeführt. Diese ließen keinen Einfluss von Forchlorfenuron auf die Bindung oder die Endozytose von CDT erkennen. Auch auf die enzymatische Aktivität von CDT in Caco-2-Zellen hatte Forchlorfenuron keinen wesentlichen Einfluss. Dies ergaben ADP-Nachribosylierungsexperimente und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen.

Weiterhin wurde der Effekt von Forchlorfenuron auf das Aktin- und Mikrotubulizytoskelett fluoreszenzmikroskopisch untersucht, da die Regulation der verschiedenen zytoskelettalen Komponenten in einem engen Wechselspiel zum Septinzytoskelett steht. Außer einer vermehrten Bildung von Aktinstressfasern konnte kein Einfluss von Forchlorfenuron auf das Aktin- und Mikrotubulizytoskelett von Caco-2-Zellen beobachtet werden, der den Ausläuferhemmenden Effekt von Forchlorfenuron erklären könnte. Untersuchungen, die Hu *et al.* 2008 durchgeführt haben, zeigten, dass Forchlorfenuron weder einen Einfluss auf die Dynamik von Mikrotubuli und Aktin in MDCK-Zellen noch auf die Polymerisation der Strukturproteine *in vitro* hat. In den hier durchgeführten fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zur Wirkung von Forchlorfenuron auf das Septinzytoskelett zeigte sich die vermehrte Bildung von langen und gebündelten Septinfilamenten, die selbst nach der Zerstörung des Aktinzytoskeletts durch CDT noch zu beobachten waren. Die CDT-induzierte Umorganisation des Septinzytoskeletts und die Bildung von Septinringen sowie von trichterförmigen Septinstrukturen am zellulären Kortex wurden durch die Forchlorfenuronbehandlung deutlich reduziert.

5.2.4. Die Septine 6 und 7 haben eine essenzielle Funktion für die Bildung CDT-induzierter Zellausläufer

Die Septine 2, 6 und 7 konnten in den Septinstrukturen an der Basis CDT-induzierter Zellausläufer immunfluoreszenzmikroskopisch identifiziert werden. Die Expression von Septin 2, 6 und 7 als GFP-Konstrukte zeigte, dass diese jeweils bei der Bildung der CDT-induzierten Ausläufer an der Plasmamembran zu finden waren. Daher konzentrierten sich die Untersuchungen zur Funktion einzelner Septine bei der Ausläuferbildung auf diese drei Septinmoleküle.

Für die Untersuchungen wurde die CDT-induzierte Ausläuferbildung nach Überexpression und Herunterregulation der einzelnen Septine in Caco-2-Zellen gemessen. Die jeweilige Überexpression der Septine 6 und 7 zeigte einen verstärkenden Einfluss auf die Bildung CDT-induzierter Zellausläufer. So waren nach 120-minütiger CDT-Behandlung etwa 60 % mehr Ausläufer messbar (μm Ausläufer/ μm Zellumfang). Die Expression von Septin 2 hatte keinen Einfluss auf die Menge der gebildeten Zellausläufer. Durch die Expression von Septin 6 und 7 bildeten sich circa 30 % längere und 30 % mehr CDT-induzierte Zellausläufer. Eine wesentliche Funktion dieser beiden Septine bei der CDT-induzierten Ausläuferbildung zeigte sich auch in Experimenten mit shRNA-Konstrukten, wobei die Expression von Septin 6- und 7-shRNA in Caco-2-Zellen zu einer Reduktion der Ausläuferbildung um jeweils

etwa 70 % nach 120-minütiger CDT-Behandlung führte. Die Expression von Septin 2-shRNA hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Ausläuferbildung. Eine spezifische Funktion der Septine 6 und 7 bei der CDT-induzierten Ausläuferbildung ist zum einen durch eine allgemeine Bedeutung der Septine für die Bildung der Septinstrukturen erklärbar, zum anderen durch spezifische Interaktionen dieser Septinmoleküle mit der Plasmamembran oder mit anderen zytoskelettalen Komponenten und assoziierten Proteinen.

Eine essenzielle Funktion der Septine 6 und 7 konnte bereits für die Ausbildung von Axonverzweigungen gezeigt werden, an deren Basis sich ähnliche Septinstrukturen bilden wie bei den CDT-induzierten Zellausläufern (Xie *et al.*, 2007; Cho *et al.*, 2011). Detaillierte Untersuchungen zur Bildung dieser Axonverzweigungen in Neuronen aus Dorsalwurzelganglien von Hühnern veranschaulichten, dass Septin 6 und Septin 7 unterschiedliche Funktionen bei der Bildung dieser zellulären Ausläufer haben. Die Initiation der Axonverzweigungen beruht auf der vom ARP2/3-Komplex vermittelten Polymerisation von Aktin und der Ausbildung von Filopodien. Es wird vermutet, dass Septin 6 für die Initiation der protrusiven Aktivität von Aktin verantwortlich ist, während Septin 7 Mikrotubuli in die entstehende Verzweigung leitet (Hu *et al.*, 2012). Für Septin 2 wurde hier keine Funktion beschrieben, jedoch spielt es eine wichtige Rolle bei der Bildung des Septinrings an der Basis primärer Zilien, wobei es ebenfalls essenziell für die Bildung der Zilien zu sein scheint (Hu *et al.*, 2010). Eine derartige Aufgabenteilung der beiden Septine 6 und 7 bei der Bildung CDT-induzierter Zellausläufer scheint unwahrscheinlich, da sich das Aktinzytoskelett nicht an der Bildung dieser Zellstrukturen beteiligt.

Septin 7 stellt das einzige Mitglied der SEPT7-Gruppe dar und ist unverzichtbar für die Bildung von Septinfilamenten (Mostowy and Cossart, 2012). So könnten die durch Überexpression oder Herunterregulation von Septin 7 hervorgerufenen Effekte auf die CDT-induzierte Ausläuferbildung neben einer spezifischen Funktion von Septin 7 auch durch eine allgemeine Wirkung auf das Septinzytoskelett hervorgerufen worden sein. Um dies genauer zu untersuchen, könnte der direkte Einfluss der Manipulation des Septin 7-Gehalts in Caco-2-Zellen auf das Septinzytoskelett bestimmt werden und der Einfluss auf den Gehalt der anderen Septine analysiert werden. In anderen Zelllinien konnte bereits ein Einfluss der Herunterregulation von Septin 7 auf die Expression anderer Septine gezeigt werden (Ghossoub *et al.*, 2013; Sellin *et al.*, 2011b; Tooley *et al.*, 2009).

Hervorzuheben ist, dass die direkte Interaktion der Septine 6 und 7 mit Mikrotubulifilamenten nachgewiesen wurde, während Septin 2 vermutlich nicht direkt mit Mikrotubuli interagiert (Bai *et al.*, 2013). So könnte die vermehrte CDT-induzierte Ausläuferbildung durch Überexpression der Septine 6 und 7 sowie die Hemmung der Ausläuferbildung durch deren Herunterregulation ihren Grund in der direkten Interaktion dieser Septine mit Mikrotubulifilamenten haben. Hierfür spricht auch die Verdickung der Ausläufer durch die Überexpression der Septine 6 oder 7 um etwa 35 %.

5.2.5. Untersuchungen zur Interaktion von Septinen mit Mikrotubuli und EB1

In epithelialen Zellen sind Septine entscheidend an der Organisation des Mikrotubulizytoskeletts beteiligt. Dies geschieht vor allem durch die Stabilisierung und die Lenkung des Mikrotubuliwachstums durch Septinfilamente. Hierfür könnte eine direkte Interaktion von Septinen mit Mikrotubuli oder EB-Proteinen verantwortlich sein, wie Bowen *et al.*, 2011 spekulierten.

Die direkte Interaktion von Mikrotubuli mit einzelnen Septinen und Septinfilamenten ist bereits gut untersucht (Bai *et al.*, 2013; Nagata *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2012). Vor allem für Septin 9 ist eine Bindung mit seiner N-terminalen Domäne an Mikrotubuli gut charakterisiert. Hier werden zwei Motive beschrieben, die aller Wahrscheinlichkeit nach durch elektrostatische Interaktionen an Mikrotubuli binden (K/R-x-x-E/D; R/K-x-E). Den Septinen 2, 6 und 7 fehlen diese N-terminalen Bindemotive. Trotzdem konnte auch eine Bindung der Septine 6 und 7 an Mikrotubuli gezeigt werden. Welche Domänen hierfür dienen, ist noch nicht genau bekannt. Spekuliert wird, dass die sauren Aminosäurereste, die aus den Mikrotubulifilamenten herausragen, die Interaktion vermitteln (Spiliotis *et al.*, 2008).

In den hier verwendeten kolorektalen Karzinomzelllinien zeigten immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen, dass ein großer Anteil der Septinfilamente mit Mikrotubulifilamenten colokalisierte. Die direkte Bindung der Septine 6 und 7 an Mikrotubuli konnte auch in dieser Arbeit nachgewiesen werden. Dies geschah durch die Verwendung rekombinanter Septine in Mikrotubuli-Spindown-Experimenten. Die Bindung von Septin 2 an Mikrotubuli konnte nicht endgültig geklärt werden, da Septin 2 auch in Abwesenheit von Mikrotubulifilamenten sedimentierte. Dies mag mit der beschriebenen Autofilamentbildung von Septin 2 in Zusammenhang stehen (Pissuti Damalio *et al.*, 2012).

In dieser Arbeit durchgeführte videomikroskopische Untersuchungen demonstrierten, dass Mikrotubuli in der Zellperipherie von Caco-2-Zellen überwiegend entlang von Septinfilamenten polymerisierten. Eine Beobachtung, die auch schon in MDCK-Zellen gemacht wurde (Bowen *et al.*, 2011). Bei Untersuchungen der Septin-Mikrotubuli-Interaktion an der Basis CDT-induzierter Zellausläufer war zu erkennen, dass Mikrotubuli entlang der Septinstrukturen an der Basis in die Ausläufer hinein polymerisierten. So könnten die trichterförmigen Septinstrukturen an der Ausläuferbasis nicht nur von grundlegender Bedeutung für die Bildung und die Stabilisierung der Ausläufer sein, sondern auch für die vermehrte Polymerisation von Mikrotubuli in die Protrusionen sorgen.

Aufgrund dieser Beobachtungen wurden Untersuchungen zur Interaktion von EB1 mit Septinen durchgeführt, da die Regulation und Lenkung des Wachstums von Mikrotubuli sowie die Interaktion mit anderen Proteinen zum größten Teil am +Ende polymerisierender Mikrotubuli stattfindet. Das +TIP EB1 spielt hierbei eine tragende Rolle als Schnittstelle zwischen dem +Ende und einer Vielzahl von Mikrotubuli-regulierenden Proteinen (Komarova *et al.*, 2009; Akhmanova and Steinmetz, 2008; Lansbergen and Akhmanova, 2006). Bei den durchgeführten Pulldown-Experimenten mit GST-EB1-beladenen Glutathion-Sepharosebeads konnte eine Bindung von Septin 2 und Septin 7 an EB1 aus Caco-2-Zelllysaten detektiert werden. In Pulldown-Experimenten, die mit rekombinanten Septinen durchgeführt wurden, konnten diese Bindungen bestätigt werden. Die Bindung von Septin 6 konnte wahrscheinlich aus technischen Gründen nicht detektiert werden, da Septin 6 zum einen genauso so schnell in der SDS-PAGE migrierte wie EB1-GST und der verfügbare polyklonale Septin 6 Antikörper zum anderen in der Immunodetektion auch effizient an GST band. Die durchgeführte Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie mit rekombinanten Septinen und EB1-GST zeigte eine stabile Bindung von EB1 an die Septine 2, 6 und 7. Die hier gemessene Affinität von EB1 zu den einzelnen Septinen lag jeweils im zweistelligen nanomolaren Bereich (Septin 2: $KD = 80,75 \pm 12,38$ nM, Septin 6: $KD = 19,85 \pm 10,97$ nM, Septin 7: $KD = 26,16 \pm 3,51$ nM). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass neben der direkten Bindung von Septinen an Mikrotubuli auch eine mögliche Interaktion der Septine mit EB-Proteinen zur Bildung der CDT-induzierten Zellausläufer beiträgt.

In fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen lassen viele Proteine, die direkt mit dem +Ende von Mikrotubuli oder EB1 interagieren, ein typisches *plus-end tracking* erkennen. Das heißt, sie lokalisieren an der Spitze polymerisierender Mikrotubuli und bewegen sich mit ihr (Akhmanova and Steinmetz, 2010; Lansbergen and Akhmanova, 2006). Dieses war für Septine bei videomikroskopischen Untersuchungen der Septin- und Mikrotubulidynamik

nicht zu beobachten. Im Fall der Septinfilamente geht man jedoch eher davon aus, dass sich die Mikrotubuli entlang von Septinfilamenten orientieren. So stellen bei der Interaktion der Septine mit Mikrotubuli die Septinfilamente wahrscheinlich die statischen Komponenten dar, die die Mikrotubulipolymerisation lenken (Bowen *et al.*, 2011; Spiliotis and Gladfelter, 2012).

Die physiologische Relevanz der beobachteten EB1-Septin-Interaktionen und deren Rolle bei der Bildung CDT-induzierter Zellausläufer bedarf weiterer spezifischerer Untersuchungen. Eine Interaktion von EB1 mit Septinfilamenten könnte ähnlich einem Mikrotubuli-Spindown-Experiment mit *in vitro* geformten Septinfilamenten untersucht werden. Außerdem ist eine Bindung von EB1 an Septinfilamente möglicherweise fluoreszenzmikroskopisch mit entsprechend markierten rekombinanten Proteinen darstellbar. Potenziell interagierende Bereiche der Proteine könnten durch zielgerichtete Mutagenese der Interaktionspartner identifiziert werden.

5.2.6. F-Aktin-Unabhängigkeit der CDT-induzierten Ausläuferbildung

F-Aktin bildet die strukturelle Grundlage der meisten zellulären Protrusionen, zum Beispiel von Filo- und Lammelpodien sowie von Mikrovilli. F-Aktin wurde ebenfalls in Septin-abhängigen Protrusionen beobachtet (Cho *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2007) und F-Aktin-abhängige zelluläre Ausläufer wurden beschrieben, die Teil des Adhäsionsmechanismus von EHEC-Bakterien an Enterozyten sind (Kenny *et al.*, 1997). Daher war es von Interesse zu prüfen, ob sich F-Aktin trotz der Aktin-depolymerisierenden Wirkung von CDT an der Bildung der CDT-induzierten Ausläufer beteiligt.

Durch verschiedene Experimente konnte hier bestätigt werden, dass F-Aktin kein Element dieser Ausläufer ist. Dies wurde bei fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen der Ausläufer festgestellt, bei denen Aktin-, Mikrotubuli- und Septinfilamente simultan angefärbt wurden. Hier war zu beobachten, dass sich F-Aktin nicht in den CDT-induzierten Zellausläufern befand, diese jedoch Mikrotubuli enthielten und sich an ihrer Basis die beschriebenen trichterförmigen Septinstrukturen befanden. Zusätzlich wurden Messungen der Fluoreszenzintensität und strukturelle Untersuchungen des kortikalen Aktin- und Septinzytoskeletts in lebendzellmikroskopischen Experimenten mit Caco-2-Zellen durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen mit *lifeact*-mCherry und Septin 6-GFP cotransfiziert. *Lifeact*-mCherry ist ein F-Aktin-bindendes Fusionsprotein, welches die fluoreszente Markierung des Aktinzytoskeletts für lebendzellmikroskopische Untersuchungen ermöglicht (Fink *et al.*, 2011). Hierbei war festzustellen, dass durch CDT-Behandlung die Abnahme des

F-Aktins am Zellkortex nach etwa 45 min begann und es nach etwa 90 min vollständig verschwunden war. In diesen Experimenten war eine CDT-induzierte Ausläuferbildung reziprok zur Abnahme des kortikalen F-Aktins zu beobachten.

Obwohl die Bildung der trichterförmigen Septinstrukturen bei der Entstehung der CDT-induzierten Zellausläufer an der Plasmamembran beobachtet werden konnten, war eine signifikante Zunahme der Septin-Fluoreszenz nach CDT-Behandlung am zellulären Kortex nicht zu detektieren. Dies lässt sich dadurch erklären, dass Septinfilamente ein Teil des kortikalen Zytoskeletts sind (Hagiwara *et al.*, 2011; Gilden and Krummel, 2010). Eine Translokation der Septine vom submembranös gelegenen kortikalen Zytoskelett an die Plasmamembran nach CDT-Behandlung lässt sich mit den hier verwendeten lebendzellmikroskopischen Methoden nicht auflösen. Gemäß verschiedenen Literaturstellen und den im Rahmen dieser Arbeit gemachten Beobachtungen ist allerdings davon auszugehen, dass es nicht nur zu einer Umorganisation bereits Membran-gebundener Septine durch CDT kommt, sondern dass auch vermehrt Septine nach der Zerstörung des Aktinzytoskeletts an die Plasmamembran binden. Bestimmungen des Septingehalts von Plasmamembranfraktionen vor und nach CDT-Behandlung könnten hier näheren Aufschluss geben und die entsprechenden Beobachtungen unterstützen.

Die Dynamik und Struktur der Septinfilamente an der Plasmamembran bei der CDT-induzierten Ausläuferbildung ähneln in Form und möglicher Funktion stark den beschriebenen Septinstrukturen an der Basis von Dendritenverzweigungen (Hu *et al.*, 2012). Die Formation dieser neuronalen Protrusionen erfolgt deutlich schneller als die Bildung der CDT-induzierten Zellausläufer, dies mag an der Beteiligung des Aktinzytoskeletts liegen und einer Regulation dieser Prozesse durch Rho-GTPasen (Spillane and Gallo, 2014).

In jüngster Zeit rückt das Septinzytoskelett in den Fokus der zellbiologischen Forschung und verschiedene Septinfunktionen in eukaryoten Zellen wurden beschrieben (Mostowy and Cossart, 2012; Spiliotis and Gladfelter, 2012). Im Fokus dabei standen auch die Form und Funktion des Septinzytoskeletts bei protrusiven Aktivitäten verschiedener Zelltypen und Organismen. An der Basis verschiedener Aktin-basierter zellulärer Protrusionen wurden bereits Septine beobachtet, vor allem in Pilz- und Nervenzellen (Hu *et al.*, 2012; Spiliotis and Gladfelter, 2012). Die hier untersuchten CDT-induzierten Protrusionen bilden sich jedoch Aktin-unabhängig, vielmehr wird ihre Bildung erst durch die Depolymerisation des Aktinzytoskeletts induziert. Die strukturelle Grundlage dieser Ausläufer bilden Mikrotubuli- und Septinfilamente, ähnlich verschiedener Zilien, deren Schaft ebenfalls von Mikrotubuli

gebildet wird und an deren Basis ebenso Septinfilamente zu finden sind (Hu *et al.*, 2010; Fliegauf *et al.*, 2014).

Die Ergebnisse dieser Arbeit führten zu der Entwicklung eines neuen Modells der CDT-induzierten Ausläuferbildung. Es wurde erweitert um die gewonnenen Erkenntnisse aus den Untersuchungen zur Rolle der Plasmamembranzusammensetzung (Ergebnisteil 4.1) und des Septinzytoskeletts (Ergebnisteil 4.2) bei der Bildung dieser Protrusionen. Das Modell ist in Abbildung 56 im Anhang dargestellt.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die *Clostridium difficile*-Transferase (CDT) ist ein binäres Aktin-ADP-ribosylierendes Toxin, das insbesondere von hypervirulenten *Clostridium difficile*-Stämmen produziert wird. Es überträgt einen ADP-Riboserest auf Arginin 177 von G-Aktin und bewirkt so die Depolymerisation des Aktinzytoskeletts in Zielzellen. Infolgedessen induziert CDT die Bildung Mikrotubuli-basierter Zellausläufer. Bereits durchgeführte Untersuchungen zur Funktion dieser Ausläufer zeigten, dass die Protrusionen ein dichtes Netzwerk auf der Zelloberfläche bilden, in dem sich die Clostridien verfangen. Dies führt zu einer erhöhten Adhäsion von *C. difficile* an epitheliale intestinale Zellen und zu einer vermehrten Kolonisation des Darms durch die Bakterien. In der vorliegenden Arbeit wurden die zellbiologischen Vorgänge, die zu der Bildung von CDT-induzierten Zellausläufern führen, näher untersucht. Die Untersuchungen konzentrierten sich dabei auf die Rolle der Plasmamembranconstitution und des Septinzytoskeletts bei der Bildung dieser Protrusionen.

In durchlichtmikroskopischen und konfokalen fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen lebender und fixierter Caco-2-Zellen wurde eine essenzielle Beteiligung von Cholesterol- und Sphingolipid-reichen Plasmamembrandomänen, sogenannten *lipid rafts*, bei der Bildung der Toxin-induzierten Zellausläufer festgestellt. Für die Manipulation der Plasmamembranconstitution wurden die Cholesterol-depletierende Substanz Methyl- β -Cyclodextrin und andere Substanzen, die das Gefüge von *lipid rafts* stören oder den Membrangehalt von Sphingolipiden senken, verwendet. Dazu dienten unter anderem das Cholesterol-bindende Polyen-Antibiotikum Nystatin, der Sphingolipidsynthese-Inhibitor Myriocin und Sphingomyelinase, die den Sphingomyelingehalt der Plasmamembran senkt. Die Behandlung mit diesen Substanzen führte zu einer deutlichen Reduktion der CDT-induzierten Ausläuferbildung. Mithilfe umfassender Kontrollexperimente konnte ausgeschlossen werden, dass die verschiedenen Manipulationen der Plasmamembran und die dabei verwendeten Substanzen einen Einfluss auf die CDT-Aufnahme und -Aktivität in Caco-2-Zellen haben. Auch die spezifischen Wirkungen von CDT auf das Aktin- und Mikrotubulizytoskelett wurden durch die Manipulation der Plasmamembran und durch die verwendeten Substanzen nicht beeinflusst. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der beiden *lipid raft*-Marker GM1 und Flotillin 2 zeigten deren Anreicherung in der Plasmamembran CDT-induzierter Zellausläufer.

Die im zweiten Teil der Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Rolle des Septinzytoskeletts bei der CDT-induzierten Ausläuferbildung demonstrierten die grundlegende Beteiligung von Septinfilamenten an der Bildung dieser Protrusionen. In konfokalen fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen von lebenden sowie fixierten Zellen verschiedener humaner kolorektaler Karzinomzelllinien wurden trichterförmige Septinstrukturen an der Basis der Ausläufer beobachtet. 3D-Rekonstruktionen konfokaler Schnittaufnahmen dieser Strukturen zeigten, dass sie sich manschettenartig um die Basis der gebildeten Zellausläufer legen. An der Bildung dieser Strukturen beteiligen sich die Septine 2, 6 und 7. Lebendzellmikroskopische Untersuchungen, die mit verschiedenen Septin-GFP-Konstrukten durchgeführt wurden, ließen erkennbar werden, dass die CDT-induzierte Ausläuferbildung an den Stellen der Plasmamembran stattfindet, an denen sich Septinakkumulationen befinden. Die Substanz Forchlorfenuron, ein Inhibitor der Dynamik und des Turnovers von Septinen, verursachte eine deutliche Hemmung der CDT-induzierten Ausläuferbildung, die auf ihre Septin-spezifische Wirkung zurückgeführt werden konnte. Die Überexpression der Septine 6 und 7 in Caco-2-Zellen führte zu einer vermehrten Ausläuferbildung, wohingegen die Herunterregulation der beiden Septine durch shRNA-Konstrukte die Ausläuferbildung signifikant hemmte. Die in dieser Arbeit beschriebenen Interaktionen von Septinen mit Mikrotubulifilamenten und EB1 könnten die Grundlage für die Entstehung der CDT-induzierten Zellausläufer bilden. Die direkte Bindung der Septine 6 und 7 an Mikrotubulifilamente würde die Verbindung des Mikrotubulizytoskeletts mit den Plasmamembran-assoziierten Septinfilamenten herstellen und auf diese Weise zur Bildung der Toxin-induzierten Protrusionen beitragen. Zusätzlich können polymerisierende Mikrotubuli durch die Septinstrukturen in die Ausläufer hinein geleitet werden. Die Membran-verformenden und -verfestigenden Eigenschaften von Septinfilamenten könnten die Entstehung und Stabilisierung der Zellausläufer vermitteln.

In dieser Arbeit wurde die Beteiligung von Cholesterol- und Sphingolipid-reichen Membrandomänen sowie die grundlegende Rolle des noch weithin unbekannten Septinzytoskeletts bei der Bildung von CDT-induzierten Zellausläufern demonstriert. Dies gewährt tiefere Einblicke in die zyto- und molekular-pathologischen Vorgänge dieses Wirt-Pathogen-Interaktionsmechanismus. Überdies tragen die Ergebnisse zum weiteren Verständnis von Form und Funktion des Septinzytoskeletts und dessen Interaktion mit anderen zytoskelettalen Komponenten bei.

7. SUMMARY

CDT (*Clostridium difficile* transferase) is a binary actin ADP-ribosylating toxin produced by *Clostridium difficile*. It catalyzes the transfer of an ADP-ribose moiety to the Arg-177 residue of G-actin. Thereby CDT leads to the disruption of the actin cytoskeleton of targeted cells. Thereupon CDT induces the formation of microtubule-based cellular protrusions. Previous studies of the function of the toxin-induced protrusions have shown that they form a dense meshwork on cellular surfaces in which Clostridia get caught. This process leads to an increased clostridial adhesion to epithelial cells and enhances colonization of *C. difficile* in the colon and caecum of mice. The work in hand deals with the cell biological mechanisms that lead to the formation of CDT-induced protrusions. The investigations focused on the role of the plasma membrane composition and the function of the septin cytoskeleton in protrusion formation.

DIC-microscopic and confocal microscopic studies of living and fixed Caco-2 cells revealed an essential role for cholesterol- and sphingolipid-rich membrane domains, so called lipid rafts, in CDT-induced protrusion formation. The cholesterol-depleting substance methyl- β -cyclodextrin and other lipid raft-disturbing agents were utilized to manipulate the plasma membrane constitution. For instance, the cholesterol-binding polyen antibiotic nystatin was used as well as myriocin, an inhibitor of sphingolipid synthesis and sphingomyelinase, which reduces the plasma membrane content of sphingomyelin. Treatment of cells with the respective substances resulted in a drastic reduction of CDT-induced protrusion formation. Different control experiments excluded an effect of the plasma membrane manipulation on uptake and activity of CDT in Caco-2 cells. Furthermore, it was shown that the manipulation of the plasma membrane did not influence the CDT-specific actions on the microtubule and actin cytoskeleton. Fluorescence microscopic studies of the lipid raft-markers GM1 and flotillin 2 revealed their enrichment in the plasma membrane along CDT-induced protrusions and the sites of their formation.

My studies on the role of septin cytoskeleton in CDT-induced protrusion formation uncovered a fundamental role of septin filaments as structural components of the toxin-induced protrusions. Confocal fluorescence microscopy of living and fixed cells of different colorectal cancer cell lines showed chevron-like septin structures at the base of CDT-induced protrusions. 3D-reconstructions of confocal stacks revealed collar-shaped septin structures enwrapping the protrusion bases. Immunofluorescence microscopy identified the

septins 2, 6 and 7 to participate in the establishment of the structures at protrusion bases. Timelapse microscopy of Caco-2 cells expressing different septin-GFP constructs revealed that CDT-induced protrusions emerge from septin accumulations at the plasma membrane. The septins 2, 6 and 7 were found at these sites. The application of forchlorfenuron, an inhibitor of septin dynamics and turnover, led to a drastic reduction of protrusion formation, which was caused by the specific action of forchlorfenuron on the septin cytoskeleton. By overexpression or knock-down of septin 6 or 7, a specific function of the distinct monomers in protrusion formation could be discovered whereas the manipulation of septin 2 levels had no significant effect on protrusion formation. Further is demonstrated that septins interact with microtubules and EB1. Specifically the observed binding of the septins 6 and 7 to microtubules can be the link between the membrane-bound septin filaments and the microtubule cytoskeleton leading to CDT-induced protrusion formation. The membrane-deforming and -rigidifying properties of septins might contribute to the formation and stabilization of the protrusions. The data further indicate that through direct interactions with microtubules and EB1 the septin structures guide polymerizing microtubules into the protrusions promoting their growth.

The work in hand demonstrates the participation of cholesterol- and sphingolipid-rich membrane domains and the fundamental role of the widely unknown septin cytoskeleton in CDT-induced protrusion formation. This provides deeper insight into the cellular and molecular pathological processes of this recently described mechanism of host pathogen interaction. Furthermore, this work contributes to the understanding of form and function of the septin cytoskeleton and its interaction with other cytoskeletal components.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Abrami L., Liu S., Cosson P., Leppla S. H., van der Goot F. G. (2003) Anthrax toxin triggers endocytosis of its receptor via a lipid raft-mediated clathrin-dependent process. *J Cell Biol*, **160**, 321-328.
- Akhmanova A., Steinmetz M. O. (2008) Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 309-322.
- Akhmanova A., Steinmetz M. O. (2010) Microtubule +TIPs at a glance. *J Cell Sci*, **123**, 3415-3419.
- Aktories K., Just I. (1995) Monoglucosylation of low-molecular-mass GTP-binding Rho proteins by clostridial cytotoxins. *Trends Cell Biol*, **5**, 441-443.
- Aktories K., Schwan C., Papatheodorou P., Lang A. E. (2012) Bidirectional attack on the actin cytoskeleton. Bacterial protein toxins causing polymerization or depolymerization of actin. *Toxicon*, **60**, 572-581.
- Angelis D., Karasmanis E. P., Bai X., Spiliotis E. T. (2014) In Silico Docking of Forchlorfenuron (FCF) to Septins Suggests that FCF Interferes with GTP Binding. *PLoS One*, **9**, e96390.
- Bacci S., Molbak K., Kjeldsen M. K., Olsen K. E. (2011) Binary toxin and death after *Clostridium difficile* infection. *Emerg Infect Dis*, **17**, 976-982.
- Bachmeyer C., Benz R., Barth H., Aktories K., Gilbert M., Popoff M. R. (2001) Interaction of *Clostridium botulinum* C2 toxin with lipid bilayer membranes and Vero cells: inhibition of channel function by chloroquine and related compounds in vitro and intoxication in vivo. *Faseb j*, **15**, 1658-1660.
- Bagatolli L. A. (2006) To see or not to see: lateral organization of biological membranes and fluorescence microscopy. *Biochim Biophys Acta*, **1758**, 1541-1556.
- Bai X., Bowen J. R., Knox T. K., Zhou K., Pendziwiat M., Kuhlenbaumer G., Sindelar C. V., Spiliotis E. T. (2013) Novel septin 9 repeat motifs altered in neuralgic amyotrophy bind and bundle microtubules. *J Cell Biol*, **203**, 895-905.
- Barral Y., Mermall V., Mooseker M. S., Snyder M. (2000) Compartmentalization of the cell cortex by septins is required for maintenance of cell polarity in yeast. *Mol Cell*, **5**, 841-851.
- Barth H., Aktories K. (2011) New insights into the mode of action of the actin ADP-ribosylating virulence factors *Salmonella enterica* SpvB and *Clostridium botulinum* C2 toxin. *Eur J Cell Biol*, **90**, 944-950.
- Barth H., Aktories K., Popoff M. R., Stiles B. G. (2004) Binary bacterial toxins: biochemistry, biology, and applications of common *Clostridium* and *Bacillus* proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*, **68**, 373-402, table of contents.
- Barth H., Blocker D., Behlke J., Bergsma-Schutter W., Brisson A., Benz R., Aktories K. (2000) Cellular uptake of *Clostridium botulinum* C2 toxin requires oligomerization and acidification. *J Biol Chem*, **275**, 18704-18711.

- Barth H., Hofmann F., Olenik C., Just I., Aktories K. (1998) The N-terminal part of the enzyme component (C2I) of the binary *Clostridium botulinum* C2 toxin interacts with the binding component C2II and functions as a carrier system for a Rho ADP-ribosylating C3-like fusion toxin. *Infect Immun*, **66**, 1364-1369.
- Bartlett J. G., Moon N., Chang T. W., Taylor N., Onderdonk A. B. (1978) Role of *Clostridium difficile* in antibiotic-associated pseudomembranous colitis. *Gastroenterology*, **75**, 778-782.
- Behrmann E., Muller M., Penczek P. A., Mannherz H. G., Manstein D. J., Raunser S. (2012) Structure of the rigor actin-tropomyosin-myosin complex. *Cell*, **150**, 327-338.
- Beise N., Trimble W. (2011) Septins at a glance. *J Cell Sci*, **124**, 4141-4146.
- Bihain B. E., Yen F. T. (1998) The lipolysis stimulated receptor: a gene at last. *Curr Opin Lipidol*, **9**, 221-224.
- Blocker D., Behlke J., Aktories K., Barth H. (2001) Cellular uptake of the *Clostridium perfringens* binary iota-toxin. *Infect Immun*, **69**, 2980-2987.
- Bloom G. S., Vallee R. B. (1983) Association of microtubule-associated protein 2 (MAP 2) with microtubules and intermediate filaments in cultured brain cells. *J Cell Biol*, **96**, 1523-1531.
- Blöcker D., Bachmeyer C., Benz R., Aktories K., Barth H. (2003a) Channel formation by the binding component of *Clostridium botulinum* C2 toxin: glutamate 307 of C2II affects channel properties in vitro and pH-dependent C2I translocation in vivo. *Biochemistry*, **42**, 5368-5377.
- Blöcker D., Behlke J., Aktories K., Barth H. (2001) Cellular uptake of the *Clostridium perfringens* binary iota-toxin. *Infect Immun*, **69**, 2980-2987.
- Blöcker D., Pohlmann K., Haug G., Bachmeyer C., Benz R., Aktories K., Barth H. (2003b) *Clostridium botulinum* C2 toxin: low pH-induced pore formation is required for translocation of the enzyme component C2I into the cytosol of host cells. *J Biol Chem*, **278**, 37360-37367.
- Bolard J. (1986) How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties? *Biochim Biophys Acta*, **864**, 257-304.
- Bowen J. R., Hwang D., Bai X., Roy D., Spiliotis E. T. (2011) Septin GTPases spatially guide microtubule organization and plus end dynamics in polarizing epithelia. *J Cell Biol*, **194**, 187-197.
- Bridges A. A., Zhang H., Mehta S. B., Occhipinti P., Tani T., Gladfelter A. S. (2014) Septin assemblies form by diffusion-driven annealing on membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **111**, 2146-2151.
- Bucciantini M., Nosi D., Forzan M., Russo E., Calamai M., Pieri L., Formigli L., Quercioli F., Soria S., Pavone F., Savistchenko J., Melki R., Stefani M. (2012) Toxic effects of amyloid fibrils on cell membranes: the importance of ganglioside GM1. *Faseb j*, **26**, 818-831.
- Byers B., Goetsch L. (1976) A highly ordered ring of membrane-associated filaments in budding yeast. *J Cell Biol*, **69**, 717-721.

- Calderon R. O., Attema B., DeVries G. H. (1995) Lipid composition of neuronal cell bodies and neurites from cultured dorsal root ganglia. *J Neurochem*, **64**, 424-429.
- Caldieri G., Buccione R. (2010) Aiming for invadopodia: organizing polarized delivery at sites of invasion. *Trends Cell Biol*, **20**, 64-70.
- Cantley L. C. (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, **296**, 1655-1657.
- Cao X., Surma M. A., Simons K. (2012) Polarized sorting and trafficking in epithelial cells. *Cell Res*, **22**, 793-805.
- Casamayor A., Snyder M. (2003) Molecular dissection of a yeast septin: distinct domains are required for septin interaction, localization, and function. *Mol Cell Biol*, **23**, 2762-2777.
- Cato E. P., Finegold S. M., George W. L. (1986) Bergey's manual of systematic bacteriology. In: pp. 1141-1200. Baltimore: The Williams & Wilkins Co.
- Caviston J. P., Longtine M., Pringle J. R., Bi E. (2003) The role of Cdc42p GTPase-activating proteins in assembly of the septin ring in yeast. *Mol Biol Cell*, **14**, 4051-4066.
- Cho S. J., Lee H., Dutta S., Song J., Walikonis R., Moon I. S. (2011) Septin 6 regulates the cytoarchitecture of neurons through localization at dendritic branch points and bases of protrusions. *Mol Cells*, **32**, 89-98.
- Christian A. E., Haynes M. P., Phillips M. C., Rothblat G. H. (1997) Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J Lipid Res*, **38**, 2264-2272.
- Cooper G. M. (2000) Microtubule Motors and Movements.
- Corda D., Di Girolamo M. (2003) Functional aspects of protein mono-ADP-ribosylation. *Embo j*, **22**, 1953-1958.
- D'Amours D., Sallmann F. R., Dixit V. M., Poirier G. G. (2001) Gain-of-function of poly(ADP-ribose) polymerase-1 upon cleavage by apoptotic proteases: implications for apoptosis. *J Cell Sci*, **114**, 3771-3778.
- Dagdas Y. F., Yoshino K., Dagdas G., Ryder L. S., Bielska E., Steinberg G., Talbot N. J. (2012) Septin-mediated plant cell invasion by the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Science*, **336**, 1590-1595.
- Davies A. H., Roberts A. K., Shone C. C., Acharya K. R. (2011) Super toxins from a super bug: structure and function of *Clostridium difficile* toxins. *Biochem J*, **436**, 517-526.
- Dawson L. F., Valiente E., Wren B. W. (2009) *Clostridium difficile*--a continually evolving and problematic pathogen. *Infect Genet Evol*, **9**, 1410-1417.
- de Murcia G., Schreiber V., Molinete M., Saulier B., Poch O., Masson M., Niedergang C., Menissier de Murcia J. (1994) Structure and function of poly(ADP-ribose) polymerase. *Mol Cell Biochem*, **138**, 15-24.
- Dehmelt L., Halpain S. (2005) The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol*, **6**, 204.

- DeMay B. S., Meseroll R. A., Occhipinti P., Gladfelter A. S. (2010) Cellular requirements for the small molecule forchlorfenuron to stabilize the septin cytoskeleton. *Cytoskeleton (Hoboken)*, **67**, 383-399.
- Desai A., Mitchison T. J. (1997) Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **13**, 83-117.
- Etienne-Manneville S. (2013) Microtubules in cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **29**, 471-499.
- Ferro A. M., Higgins N. P., Olivera B. M. (1983) Poly(ADP-ribosylation) of a DNA topoisomerase. *J Biol Chem*, **258**, 6000-6003.
- Fink J., Carpi N., Betz T., Betard A., Chebah M., Azioune A., Bornens M., Sykes C., Fetler L., Cuvelier D., Piel M. (2011) External forces control mitotic spindle positioning. *Nat Cell Biol*, **13**, 771-778.
- Fliegauf M., Kahle A., Haffner K., Zieger B. (2014) Distinct localization of septin proteins to ciliary sub-compartments in airway epithelial cells. *Biol Chem*, **395**, 151-156.
- Ford S. K., Pringle J. R. (1991) Cellular morphogenesis in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle: localization of the CDC11 gene product and the timing of events at the budding site. *Dev Genet*, **12**, 281-292.
- Garcia G., 3rd, Bertin A., Li Z., Song Y., McMurray M. A., Thorner J., Nogales E. (2011) Subunit-dependent modulation of septin assembly: budding yeast septin Shs1 promotes ring and gauze formation. *J Cell Biol*, **195**, 993-1004.
- Gavrieli Y., Sherman Y., Ben-Sasson S. A. (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, **119**, 493-501.
- Geipel U., Just I., Schering B., Haas D., Aktories K. (1989) ADP-ribosylation of actin causes increase in the rate of ATP exchange and inhibition of ATP hydrolysis. *Eur J Biochem*, **179**, 229-232.
- Gerding D. N., Johnson S., Rupnik M., Aktories K. (2014) binary toxin CDT: Mechanism, epidemiology, and potential clinical importance. In: *Gut Microbes*, pp. 15-27.
- Ghossoub R., Hu Q., Failler M., Rouyez M. C., Spitzbarth B., Mostowy S., Wolfrum U., Saunier S., Cossart P., Jamesnelson W., Benmerah A. (2013) Septins 2, 7 and 9 and MAP4 colocalize along the axoneme in the primary cilium and control ciliary length. *J Cell Sci*, **126**, 2583-2594.
- Gilden J., Krummel M. F. (2010) Control of cortical rigidity by the cytoskeleton: emerging roles for septins. *Cytoskeleton (Hoboken)*, **67**, 477-486.
- Gimpl G., Gehrig-Burger K. (2007) Cholesterol reporter molecules. *Biosci Rep*, **27**, 335-358.
- Gladfelter A. S., Bose I., Zyla T. R., Bardes E. S., Lew D. J. (2002) Septin ring assembly involves cycles of GTP loading and hydrolysis by Cdc42p. *J Cell Biol*, **156**, 315-326.
- Golub T., Caroni P. (2005) PI(4,5)P2-dependent microdomain assemblies capture microtubules to promote and control leading edge motility. *J Cell Biol*, **169**, 151-165.

- Goorhuis A., Debast S. B., van Leengoed L. A., Harmanus C., Notermans D. W., Bergwerff A. A., Kuijper E. J. (2008) Clostridium difficile PCR ribotype 078: an emerging strain in humans and in pigs? *In: J Clin Microbiol*, p. 1157; author reply 1158. United States.
- Grundner M., Zemljic Jokhadar S. (2014) Cytoskeleton modification and cholesterol depletion affect membrane properties and caveolae positioning of CHO cells. *J Membr Biol*, **247**, 201-210.
- Haarer B. K., Pringle J. R. (1987) Immunofluorescence localization of the Saccharomyces cerevisiae CDC12 gene product to the vicinity of the 10-nm filaments in the mother-bud neck. *Mol Cell Biol*, **7**, 3678-3687.
- Hagiwara A., Tanaka Y., Hikawa R., Morone N., Kusumi A., Kimura H., Kinoshita M. (2011) Submembranous septins as relatively stable components of actin-based membrane skeleton. *Cytoskeleton (Hoboken)*, **68**, 512-525.
- Hale M. L., Marvaud J. C., Popoff M. R., Stiles B. G. (2004) Detergent-resistant membrane microdomains facilitate Ib oligomer formation and biological activity of Clostridium perfringens iota-toxin. *Infect Immun*, **72**, 2186-2193.
- Hall A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, **279**, 509-514.
- Hall A., Nobes C. D. (2000) Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **355**, 965-970.
- Hall I. C., O'Toole E. (1935) Intestinal Flora In New-Born Infants With A Description Of A New Pathogenic Anaerob, Bacillus Difficilis. *In: pp.* 390-402. *Am J Dis Child*.
- Hammond A. T., Heberle F. A., Baumgart T., Holowka D., Baird B., Feigenson G. W. (2005) Crosslinking a lipid raft component triggers liquid ordered-liquid disordered phase separation in model plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 6320-6325.
- Han S., Craig J. A., Putnam C. D., Carozzi N. B., Tainer J. A. (1999) Evolution and mechanism from structures of an ADP-ribosylating toxin and NAD complex. *Nat Struct Biol*, **6**, 932-936.
- Harder T., Scheiffele P., Verkade P., Simons K. (1998) Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J Cell Biol*, **141**, 929-942.
- Hartwell L. H. (1971) Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. *Exp Cell Res*, **69**, 265-276.
- Hatheway C. L. (1990) Toxigenic clostridia. *Clin Microbiol Rev*, **3**, 66-98.
- Haug G., Aktories K., Barth H. (2004) The host cell chaperone Hsp90 is necessary for cytotoxic action of the binary iota-like toxins. *Infect Immun*, **72**, 3066-3068.
- Haug G., Wilde C., Leemhuis J., Meyer D. K., Aktories K., Barth H. (2003) Cellular uptake of Clostridium botulinum C2 toxin: membrane translocation of a fusion toxin requires unfolding of its dihydrofolate reductase domain. *Biochemistry*, **42**, 15284-15291.
- Heasman S. J., Ridley A. J. (2008) Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 690-701.

- Higashi T., Tokuda S., Kitajiri S., Masuda S., Nakamura H., Oda Y., Furuse M. (2013) Analysis of the 'angulin' proteins LSR, ILDR1 and ILDR2--tricellulin recruitment, epithelial barrier function and implication in deafness pathogenesis. *J Cell Sci*, **126**, 966-977.
- Honjo T., Nishizuka Y., Hayaishi O. (1968) Diphtheria toxin-dependent adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis. *J Biol Chem*, **243**, 3553-3555.
- Hu J., Bai X., Bowen J. R., Dolat L., Korobova F., Yu W., Baas P. W., Svitkina T., Gallo G., Spiliotis E. T. (2012) Septin-driven coordination of actin and microtubule remodeling regulates the collateral branching of axons. *Curr Biol*, **22**, 1109-1115.
- Hu Q., Milenkovic L., Jin H., Scott M. P., Nachury M. V., Spiliotis E. T., Nelson W. J. (2010) A septin diffusion barrier at the base of the primary cilium maintains ciliary membrane protein distribution. *Science*, **329**, 436-439.
- Hu Q., Nelson W. J., Spiliotis E. T. (2008) Forchlorfenuron alters mammalian septin assembly, organization, and dynamics. *J Biol Chem*, **283**, 29563-29571.
- Huang J., Feigenson G. W. (1999) A microscopic interaction model of maximum solubility of cholesterol in lipid bilayers. *Biophys J*, **76**, 2142-2157.
- Huttner W. B., Zimmerberg J. (2001) Implications of lipid microdomains for membrane curvature, budding and fission. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 478-484.
- Illenberger S., Drewes G., Trinczek B., Biernat J., Meyer H. E., Olmsted J. B., Mandelkow E.-M., Mandelkow E. (1996) Phosphorylation of Microtubule-associated Proteins MAP2 and MAP4 by the Protein Kinase p110.
- Ipsen J. H., Karlstrom G., Mouritsen O. G., Wennerstrom H., Zuckermann M. J. (1987) Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. *Biochim Biophys Acta*, **905**, 162-172.
- Jacobson K., Mouritsen O. G., Anderson R. G. (2007) Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics. *Nat Cell Biol*, **9**, 7-14.
- Janich P., Corbeil D. (2007) GM1 and GM3 gangliosides highlight distinct lipid microdomains within the apical domain of epithelial cells. *FEBS Lett*, **581**, 1783-1787.
- Joberty G., Perlungher R. R., Sheffield P. J., Kinoshita M., Noda M., Haystead T., Macara I. G. (2001) Borg proteins control septin organization and are negatively regulated by Cdc42. *Nat Cell Biol*, **3**, 861-866.
- Jones K. T., Zhen J., Reith M. E. (2012) Importance of cholesterol in dopamine transporter function. *J Neurochem*, **123**, 700-715.
- Joo E., Surka M. C., Trimble W. S. (2007) Mammalian SEPT2 is required for scaffolding nonmuscle myosin II and its kinases. *Dev Cell*, **13**, 677-690.
- Just I., Selzer J., von Eichel-Streiber C., Aktories K. (1995) The low molecular mass GTP-binding protein Rho is affected by toxin A from *Clostridium difficile*. *J Clin Invest*, **95**, 1026-1031.

- Kabsch W., Vandekerckhove J. (1992) Structure and function of actin. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **21**, 49-76.
- Kaiser E., Pust S., Kroll C., Barth H. (2009) Cyclophilin A facilitates translocation of the Clostridium botulinum C2 toxin across membranes of acidified endosomes into the cytosol of mammalian cells. *Cell Microbiol*, **11**, 780-795.
- Keel K., Brazier J. S., Post K. W., Weese S., Songer J. G. (2007) Prevalence of PCR ribotypes among Clostridium difficile isolates from pigs, calves, and other species. *J Clin Microbiol*, **45**, 1963-1964.
- Keel M. K., Songer J. G. (2006) The comparative pathology of Clostridium difficile-associated disease. *Vet Pathol*, **43**, 225-240.
- Keessen E. C., Gaastra W., Lipman L. J. (2011) Clostridium difficile infection in humans and animals, differences and similarities. *Vet Microbiol*, **153**, 205-217.
- Kelly C. P., LaMont J. T. (2008) Clostridium difficile--more difficult than ever. *N Engl J Med*, **359**, 1932-1940.
- Kelly C. P., Pothoulakis C., LaMont J. T. (1994) Clostridium difficile colitis. *N Engl J Med*, **330**, 257-262.
- Kenny B., DeVinney R., Stein M., Reinscheid D. J., Frey E. A., Finlay B. B. (1997) Enteropathogenic E. coli (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell*, **91**, 511-520.
- Khatibzadeh N., Spector A. A., Brownell W. E., Anvari B. (2013) Effects of plasma membrane cholesterol level and cytoskeleton F-actin on cell protrusion mechanics. *PLoS One*, **8**, e57147.
- Kim H. B., Haarer B. K., Pringle J. R. (1991) Cellular morphogenesis in the Saccharomyces cerevisiae cell cycle: localization of the CDC3 gene product and the timing of events at the budding site. *J Cell Biol*, **112**, 535-544.
- Kim M. J., Hong J. Y., Lee K. E., Kim K. W., Sohn M. H., Kim K. E. (2013) Effect of cholesterol depletion on interleukin-8 production in human respiratory epithelial cells. *Allergy Asthma Immunol Res*, **5**, 402-408.
- Kim S. K., Shindo A., Park T. J., Oh E. C., Ghosh S., Gray R. S., Lewis R. A., Johnson C. A., Attie-Bittach T., Katsanis N., Wallingford J. B. (2010) Planar cell polarity acts through septins to control collective cell movement and ciliogenesis. *Science*, **329**, 1337-1340.
- Kinoshita M., Field C. M., Coughlin M. L., Straight A. F., Mitchison T. J. (2002) Self- and actin-templated assembly of Mammalian septins. *Dev Cell*, **3**, 791-802.
- Kirschner M. W. (1980) Implications of treadmilling for the stability and polarity of actin and tubulin polymers in vivo. *J Cell Biol*, **86**, 330-334.
- Komarova Y., De Groot C. O., Grigoriev I., Gouveia S. M., Munteanu E. L., Schober J. M., Honnappa S., Buey R. M., Hoogenraad C. C., Dogterom M., Borisy G. G., Steinmetz M. O., Akhmanova A. (2009) Mammalian end binding proteins control persistent microtubule growth. *J Cell Biol*, **184**, 691-706.

- Krantz B. A., Finkelstein A., Collier R. J. (2006) Protein translocation through the anthrax toxin transmembrane pore is driven by a proton gradient. *J Mol Biol*, **355**, 968-979.
- Krantz B. A., Melnyk R. A., Zhang S., Juris S. J., Lacy D. B., Wu Z., Finkelstein A., Collier R. J. (2005) A phenylalanine clamp catalyzes protein translocation through the anthrax toxin pore. *Science*, **309**, 777-781.
- Krantz B. A., Trivedi A. D., Cunningham K., Christensen K. A., Collier R. J. (2004) Acid-induced unfolding of the amino-terminal domains of the lethal and edema factors of anthrax toxin. *J Mol Biol*, **344**, 739-756.
- Krueger K. M., Barbieri J. T. (1995) The family of bacterial ADP-ribosylating exotoxins. *Clin Microbiol Rev*, **8**, 34-47.
- Lang A. E., Neumeyer T., Sun J., Collier R. J., Benz R., Aktories K. (2008) Amino acid residues involved in membrane insertion and pore formation of *Clostridium botulinum* C2 toxin. *Biochemistry*, **47**, 8406-8413.
- Lang A. E., Schmidt G., Schlosser A., Hey T. D., Larrinua I. M., Sheets J. J., Mannherz H. G., Aktories K. (2010) *Photobacterium luminescens* toxins ADP-ribosylate actin and RhoA to force actin clustering. *Science*, **327**, 1139-1142.
- Lansbergen G., Akhmanova A. (2006) Microtubule plus end: a hub of cellular activities. *Traffic*, **7**, 499-507.
- Lappalainen P., Drubin D. G. (1997) Cofilin promotes rapid actin filament turnover in vivo. *Nature*, **388**, 78-82.
- Larive R. M., Baisamy L., Urbach S., Coopman P., Bettache N. (2010) Cell membrane extensions, generated by mechanical constraint, are associated with a sustained lipid raft patching and an increased cell signaling. *Biochim Biophys Acta*, **1798**, 389-400.
- Lee M. K., Walters F. S., Hart H., Palekar N., Chen J. S. (2003) The Mode of Action of the *Bacillus thuringiensis* Vegetative Insecticidal Protein Vip3A Differs from That of Cry1Ab δ -Endotoxin. *Appl Environ Microbiol*, **69**, 4648-4657.
- Leipe D. D., Wolf Y. I., Koonin E. V., Aravind L. (2002) Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *J Mol Biol*, **317**, 41-72.
- Lentz B. R., Barrow D. A., Hoechli M. (1980) Cholesterol-phosphatidylcholine interactions in multilamellar vesicles. *Biochemistry*, **19**, 1943-1954.
- Li H., Yun H. Y., Baek K. J., Kwon N. S., Park K. C., Kim D. S. (2014) Myriocin, a serine palmitoyltransferase inhibitor, increases melanin synthesis in Mel-A5 cells and a skin equivalent model. *Pharmazie*, **69**, 187-191.
- Lindeboom J. J., Nakamura M., Hibbel A., Shundyak K., Gutierrez R., Ketelaar T., Emons A. M., Mulder B. M., Kirik V., Ehrhardt D. W. (2013) A mechanism for reorientation of cortical microtubule arrays driven by microtubule severing. *Science*, **342**, 1245533.
- Lingwood D., Simons K. (2010) Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, **327**, 46-50.

- Liu J. P., Zeitlin S. O. (2011) The long and the short of aberrant ciliogenesis in Huntington disease. *J Clin Invest*, **121**, 4237-4241.
- Liu S. L., May J. R., Helgeson L. A., Nolen B. J. (2013) Insertions within the actin core of actin-related protein 3 (Arp3) modulate branching nucleation by Arp2/3 complex. *J Biol Chem*, **288**, 487-497.
- Lukac M., Collier R. J. (1988) *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A: effects of mutating tyrosine-470 and tyrosine-481 to phenylalanine. *Biochemistry*, **27**, 7629-7632.
- Maimaitiyiming M., Kumanogoh H., Nakamura S., Nagata K., Suzaki T., Maekawa S. (2008) Biochemical characterization of membrane-associated septin from rat brain. *J Neurochem*, **106**, 1175-1183.
- Margheri G., D'Agostino R., Trigari S., Sottini S., Del Rosso M. (2014) The beta-subunit of cholera toxin has a high affinity for ganglioside GM1 embedded into solid supported lipid membranes with a lipid raft-like composition. *Lipids*, **49**, 203-206.
- Martin S. W., Konopka J. B. (2004) Lipid raft polarization contributes to hyphal growth in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*, **3**, 675-684.
- Matsuda S., Kodama T., Okada N., Okayama K., Honda T., Iida T. (2010) Association of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin with lipid rafts is essential for cytotoxicity but not hemolytic activity. *Infect Immun*, **78**, 603-610.
- McDonald L. C., Killgore G. E., Thompson A., Owens R. C., Kazakova S. V., Sambol S. P., Johnson S., Gerding D. N. (2005) An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. *N Engl J Med*, **353**, 2433-2441.
- McMurray M. A., Thorner J. (2009) Reuse, replace, recycle. Specificity in subunit inheritance and assembly of higher-order septin structures during mitotic and meiotic division in budding yeast. *Cell Cycle*, **8**, 195-203.
- Mendoza M., Hyman A. A., Glotzer M. (2002) GTP binding induces filament assembly of a recombinant septin. *Curr Biol*, **12**, 1858-1863.
- Mesli S., Javorschi S., Berard A. M., Landry M., Priddle H., Kivlichan D., Smith A. J., Yen F. T., Bihain B. E., Darmon M. (2004) Distribution of the lipolysis stimulated receptor in adult and embryonic murine tissues and lethality of LSR^{-/-} embryos at 12.5 to 14.5 days of gestation. *Eur J Biochem*, **271**, 3103-3114.
- Mitchison T. J. (1995) Evolution of a dynamic cytoskeleton. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **349**, 299-304.
- Moss J., Garrison S., Oppenheimer N. J., Richardson S. H. (1979) NAD-dependent ADP-ribosylation of arginine and proteins by *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *J Biol Chem*, **254**, 6270-6272.
- Mostowy S., Cossart P. (2012) Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **13**, 183-194.
- Mostowy S., Danckaert A., Tham T. N., Machu C., Guadagnini S., Pizarro-Cerda J., Cossart P. (2009a) Septin 11 restricts InlB-mediated invasion by *Listeria*. *J Biol Chem*, **284**, 11613-

11621.

Mostowy S., Janel S., Forestier C., Roduit C., Kasas S., Pizarro-Cerda J., Cossart P., Lafont F. (2011) A role for septins in the interaction between the *Listeria monocytogenes* INVASION PROTEIN InlB and the Met receptor. *Biophys J*, **100**, 1949-1959.

Mostowy S., Nam Tham T., Danckaert A., Guadagnini S., Boisson-Dupuis S., Pizarro-Cerda J., Cossart P. (2009b) Septins regulate bacterial entry into host cells. *PLoS One*, **4**, e4196.

Musch A. (2004) Microtubule organization and function in epithelial cells. *Traffic*, **5**, 1-9.

Nagahama M., Yamaguchi A., Hagiya T., Ohkubo N., Kobayashi K., Sakurai J. (2004) Binding and internalization of *Clostridium perfringens* iota-toxin in lipid rafts. *Infect Immun*, **72**, 3267-3275.

Nagata K., Kawajiri A., Matsui S., Takagishi M., Shiromizu T., Saitoh N., Izawa I., Kiyono T., Itoh T. J., Hotani H., Inagaki M. (2003) Filament formation of MSF-A, a mammalian septin, in human mammary epithelial cells depends on interactions with microtubules. *J Biol Chem*, **278**, 18538-18543.

Nagy E., Balogi Z., Gombos I., Akerfelt M., Bjorkbom A., Balogh G., Torok Z., Maslyanko A., Fiszer-Kierzkowska A., Lisowska K., Slotte P. J., Sistonen L., Horvath I., Vigh L. (2007) Hyperfluidization-coupled membrane microdomain reorganization is linked to activation of the heat shock response in a murine melanoma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 7945-7950.

Narvekar P., Berriel Diaz M., Kronen-Herzig A., Hardeland U., Strzoda D., Stohr S., Frohme M., Herzig S. (2009) Liver-specific loss of lipolysis-stimulated lipoprotein receptor triggers systemic hyperlipidemia in mice. *Diabetes*, **58**, 1040-1049.

Nichols B. J., Lippincott-Schwartz J. (2001) Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol*, **11**, 406-412.

Niggli V., Meszaros A. V., Oppliger C., Tornay S. (2004) Impact of cholesterol depletion on shape changes, actin reorganization, and signal transduction in neutrophil-like HL-60 cells. *Exp Cell Res*, **296**, 358-368.

Ogata N., Ueda K., Kagamiyama H., Hayaishi O. (1980) ADP-ribosylation of histone H1. Identification of glutamic acid residues 2, 14, and the COOH-terminal lysine residue as modification sites. *J Biol Chem*, **255**, 7616-7620.

Oh Y., Bi E. (2011) Septin structure and function in yeast and beyond. *Trends Cell Biol*, **21**, 141-148.

Ohishi I. (1983) Lethal and vascular permeability activities of botulinum C2 toxin induced by separate injections of the two toxin components. *Infect Immun*, **40**, 336-339.

Ohishi I., Iwasaki M., Sakaguchi G. (1980) Purification and characterization of two components of botulinum C2 toxin. *Infect Immun*, **30**, 668-673.

Okazaki I. J., Moss J. (1999) Characterization of glycosylphosphatidylinositol-anchored, secreted, and intracellular vertebrate mono-ADP-ribosyltransferases. *Annu Rev Nutr*, **19**, 485-509.

- Pankov R., Markovska T., Antonov P., Ivanova L., Momchilova A. (2006) The plasma membrane lipid composition affects fusion between cells and model membranes. *Chem Biol Interact*, **164**, 167-173.
- Papatheodorou P., Carette J. E., Bell G. W., Schwan C., Guttenberg G., Brummelkamp T. R., Aktories K. (2011) Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR) is the host receptor for the binary toxin Clostridium difficile transferase (CDT). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 16422-16427.
- Papatheodorou P., Hornuss D., Nölke T., Hemmasi S., Castonguay J., Picchianti M., Aktories K. (2013) Clostridium difficile binary toxin CDT induces clustering of the lipolysis-stimulated lipoprotein receptor into lipid rafts. *MBio*, **4**, e00244-00213.
- Papatheodorou P., Wilczek C., Nolke T., Guttenberg G., Hornuss D., Schwan C., Aktories K. (2012) Identification of the cellular receptor of Clostridium spiroforme toxin. *Infect Immun*, **80**, 1418-1423.
- Passador L., Iglewski W. (1994) ADP-ribosylating toxins. *Methods Enzymol*, **235**, 617-631.
- Perelle S., Gibert M., Boquet P., Popoff M. R. (1993) Characterization of Clostridium perfringens iota-toxin genes and expression in Escherichia coli. *Infect Immun*, **61**, 5147-5156.
- Perelle S., Gibert M., Bourlioux P., Corthier G., Popoff M. R. (1997) Production of a complete binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) by Clostridium difficile CD196. *Infect Immun*, **65**, 1402-1407.
- Petosa C., Collier R. J., Klimpel K. R., Leppla S. H., Liddington R. C. (1997) Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen. *Nature*, **385**, 833-838.
- Phan Q. T., Eng D. K., Mostowy S., Park H., Cossart P., Filler S. G. (2013) Role of endothelial cell septin 7 in the endocytosis of Candida albicans. *MBio*, **4**, e00542-00513.
- Pieper A. A., Verma A., Zhang J., Snyder S. H. (1999) Poly (ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death. *Trends Pharmacol Sci*, **20**, 171-181.
- Pissuti Damalio J. C., Garcia W., Alves Macedo J. N., de Almeida Marques I., Andreu J. M., Giraldo R., Garratt R. C., Ulian Araujo A. P. (2012) Self assembly of human septin 2 into amyloid filaments. *Biochimie*, **94**, 628-636.
- Pollard T. D., Cooper J. A. (2009) Actin, a central player in cell shape and movement. *Science*, **326**, 1208-1212.
- Poole K., Meder D., Simons K., Muller D. (2004) The effect of raft lipid depletion on microvilli formation in MDCK cells, visualized by atomic force microscopy. *FEBS Lett*, **565**, 53-58.
- Popoff M. R. (2014) Clostridial pore-forming toxins: Powerful virulence factors. *Anaerobe*.
- Popoff M. R., Rubin E. J., Gill D. M., Boquet P. (1988) Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a Clostridium difficile strain. *Infect Immun*, **56**, 2299-2306.

- Porte F., Harricane M. C. (1986) Interactions of plasma gelsolin with actin. Isolation and characterization of binary and ternary plasma-gelsolin-actin complexes. *Eur J Biochem*, **154**, 87-93.
- Prokop A. (2013) The intricate relationship between microtubules and their associated motor proteins during axon growth and maintenance. *Neural Dev*, **8**, 17.
- Prydz K., Simons K. (2001) Cholesterol depletion reduces apical transport capacity in epithelial Madin-Darby canine kidney cells. *Biochem J*, **357**, 11-15.
- Pryor S., McCaffrey G., Young L. R., Grimes M. L. (2012) NGF causes TrkA to specifically attract microtubules to lipid rafts. *PLoS One*, **7**, e35163.
- Rhee H. J., Ji L., Kim S. H., Lee J. (2013) Human group V secretory phospholipase A2 is associated with lipid rafts and internalized in a flotillin-independent pathway. *Int J Mol Med*, **32**, 1126-1136.
- Riedl J., Crevenna A. H., Kessenbrock K., Yu J. H., Neukirchen D., Bista M., Bradke F., Jenne D., Holak T. A., Werb Z., Sixt M., Wedlich-Soldner R. (2008) Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat Methods*, **5**, 605-607.
- Riento K., Frick M., Schafer I., Nichols B. J. (2009) Endocytosis of flotillin-1 and flotillin-2 is regulated by Fyn kinase. *J Cell Sci*, **122**, 912-918.
- Römer W., Berland L., Chambon V., Gaus K., Windschiegel B., Tenza D., Aly M. R., Fraisier V., Florent J. C., Perrais D., Lamaze C., Raposo G., Steinem C., Sens P., Bassereau P., Johannes L. (2007) Shiga toxin induces tubular membrane invaginations for its uptake into cells. *Nature*, **450**, 670-675.
- Sadian Y., Gatsogiannis C., Patasi C., Hofnagel O., Goody R. S., Farkasovsky M., Raunser S. (2013) The role of Cdc42 and Gic1 in the regulation of septin filament formation and dissociation. *Elife*, **2**, e01085.
- Salinas S., Carazo-Salas R. E., Proukakis C., Schiavo G., Warner T. T. (2007) Spastin and microtubules: Functions in health and disease. *J Neurosci Res*, **85**, 2778-2782.
- Schering B., Barmann M., Chhatwal G. S., Geipel U., Aktories K. (1988) ADP-ribosylation of skeletal muscle and non-muscle actin by *Clostridium perfringens* iota toxin. *Eur J Biochem*, **171**, 225-229.
- Schmid A., Benz R., Just I., Aktories K. (1994) Interaction of *Clostridium botulinum* C2 toxin with lipid bilayer membranes. Formation of cation-selective channels and inhibition of channel function by chloroquine. *J Biol Chem*, **269**, 16706-16711.
- Schmidt K., Nichols B. J. (2004) Functional interdependence between septin and actin cytoskeleton. *BMC Cell Biol*, **5**, 43.
- Schwan C., Kruppke A. S., Nolke T., Schumacher L., Koch-Nolte F., Kudryashev M., Stahlberg H., Aktories K. (2014) *Clostridium difficile* toxin CDT hijacks microtubule organization and reroutes vesicle traffic to increase pathogen adherence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **111**, 2313-2318.

- Schwan C., Stecher B., Tzivelekidis T., van Ham M., Rohde M., Hardt W. D., Wehland J., Aktories K. (2009) Clostridium difficile toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria. *PLoS Pathog*, **5**, e1000626.
- Segawa K., Kurata S., Yanagihashi Y., Brummelkamp T. R., Matsuda F., Nagata S. (2014) Caspase-mediated cleavage of phospholipid flippase for apoptotic phosphatidylserine exposure. *Science*, **344**, 1164-1168.
- Sellin M. E., Holmfeldt P., Stenmark S., Gullberg M. (2011a) Microtubules support a disk-like septin arrangement at the plasma membrane of mammalian cells. *Mol Biol Cell*, **22**, 4588-4601.
- Sellin M. E., Sandblad L., Stenmark S., Gullberg M. (2011b) Deciphering the rules governing assembly order of mammalian septin complexes. *Mol Biol Cell*, **22**, 3152-3164.
- Sellin M. E., Stenmark S., Gullberg M. (2014) Cell type-specific expression of SEPT3-homology subgroup members controls the subunit number of heteromeric septin complexes. *Mol Biol Cell*, **25**, 1594-1607.
- Semis R., Kagan S., Berdicevsky I., Polacheck I., Segal E. (2013) Mechanism of activity and toxicity of Nystatin-Intralipid. *Med Mycol*, **51**, 422-431.
- Sheffield P. J., Oliver C. J., Kremer B. E., Sheng S., Shao Z., Macara I. G. (2003) Borg/septin interactions and the assembly of mammalian septin heterodimers, trimers, and filaments. *J Biol Chem*, **278**, 3483-3488.
- Shirao T., Gonzalez-Billault C. (2013) Actin filaments and microtubules in dendritic spines. *J Neurochem*, **126**, 155-164.
- Simons K., Ikonen E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature*, **387**, 569-572.
- Simons K., Vaz W. L. (2004) Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **33**, 269-295.
- Simonsen A., Wurmser A. E., Emr S. D., Stenmark H. (2001) The role of phosphoinositides in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 485-492.
- Simpson L. L. (1982) A comparison of the pharmacological properties of Clostridium botulinum type C1 and C2 toxins. *J Pharmacol Exp Ther*, **223**, 695-701.
- Simpson L. L., Stiles B. G., Zepeda H., Wilkins T. D. (1989) Production by Clostridium spiroforme of an iota-like toxin that possesses mono(ADP-ribosyl)transferase activity: identification of a novel class of ADP-ribosyltransferases. *Infect Immun*, **57**, 255-261.
- Singer S. J., Nicolson G. L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, **175**, 720-731.
- Sirajuddin M., Farkasovsky M., Hauer F., Kuhlmann D., Macara I. G., Weyand M., Stark H., Wittinghofer A. (2007) Structural insight into filament formation by mammalian septins. *Nature*, **449**, 311-315.

- Sirajuddin M., Farkasovsky M., Zent E., Wittinghofer A. (2009) GTP-induced conformational changes in septins and implications for function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 16592-16597.
- Sobel A. (1991) Stathmin: a relay phosphoprotein for multiple signal transduction? *Trends Biochem Sci*, **16**, 301-305.
- Solomon S., Masilamani M., Rajendran L., Bastmeyer M., Stuermer C. A., Illges H. (2002) The lipid raft microdomain-associated protein reggie-1/flotillin-2 is expressed in human B cells and localized at the plasma membrane and centrosome in PBMCs. *Immunobiology*, **205**, 108-119.
- Songer J. G. (2004) The emergence of *Clostridium difficile* as a pathogen of food animals. *Anim Health Res Rev*, **5**, 321-326.
- Songer J. G., Anderson M. A. (2006) *Clostridium difficile*: an important pathogen of food animals. *Anaerobe*, **12**, 1-4.
- Spiliotis E. T. (2010) Regulation of microtubule organization and functions by septin GTPases. *Cytoskeleton (Hoboken)*, **67**, 339-345.
- Spiliotis E. T., Gladfelter A. S. (2012) Spatial guidance of cell asymmetry: septin GTPases show the way. *Traffic*, **13**, 195-203.
- Spiliotis E. T., Hunt S. J., Hu Q., Kinoshita M., Nelson W. J. (2008) Epithelial polarity requires septin coupling of vesicle transport to polyglutamylated microtubules. *J Cell Biol*, **180**, 295-303.
- Spiliotis E. T., Nelson W. J. (2006) Here come the septins: novel polymers that coordinate intracellular functions and organization. *J Cell Sci*, **119**, 4-10.
- Spillane M., Gallo G. (2014) Involvement of Rho-family GTPases in axon branching. *Small GTPases*, **5**.
- Steigemann P., Wurzenberger C., Schmitz M. H., Held M., Guizetti J., Maar S., Gerlich D. W. (2009) Aurora B-mediated abscission checkpoint protects against tetraploidization. *Cell*, **136**, 473-484.
- Steinmetz M. O. (2007) Structure and thermodynamics of the tubulin-stathmin interaction. *J Struct Biol*, **158**, 137-147.
- Stepanova T., Slemmer J., Hoogenraad C. C., Lansbergen G., Dortland B., De Zeeuw C. I., Grosveld F., van Cappellen G., Akhmanova A., Galjart N. (2003) Visualization of microtubule growth in cultured neurons via the use of EB3-GFP (end-binding protein 3-green fluorescent protein). *J Neurosci*, **23**, 2655-2664.
- Sterthoff C., Lang A. E., Schwan C., Tauch A., Aktories K. (2010) Functional characterization of an extended binding component of the actin-ADP-ribosylating C2 toxin detected in *Clostridium botulinum* strain (C) 2300. *Infect Immun*, **78**, 1468-1474.

- Stiles B. G., Wilkins T. D. (1986) Clostridium perfringens iota toxin: synergism between two proteins. *Toxicon*, **24**, 767-773.
- Stuermer C. A. (2010) The reggie/flotillin connection to growth. *Trends Cell Biol*, **20**, 6-13.
- Sugimura T., Miwa M. (1994) Poly(ADP-ribose): historical perspective. *Mol Cell Biochem*, **138**, 5-12.
- Sundriyal A., Roberts A. K., Shone C. C., Acharya K. R. (2009) Structural basis for substrate recognition in the enzymatic component of ADP-ribosyltransferase toxin CDTa from Clostridium difficile. *J Biol Chem*, **284**, 28713-28719.
- Tada T., Simonetta A., Batterton M., Kinoshita M., Edbauer D., Sheng M. (2007) Role of Septin cytoskeleton in spine morphogenesis and dendrite development in neurons. *Curr Biol*, **17**, 1752-1758.
- Takada T., Okazaki I. J., Moss J. (1994) ADP-ribosylarginine hydrolases. *Mol Cell Biochem*, **138**, 119-122.
- Takeda T., Kawate T., Chang F. (2004) Organization of a sterol-rich membrane domain by cdc15p during cytokinesis in fission yeast. *Nature Cell Biology*, **6**, 1142-1144.
- Takizawa P. A., DeRisi J. L., Wilhelm J. E., Vale R. D. (2000) Plasma membrane compartmentalization in yeast by messenger RNA transport and a septin diffusion barrier. *Science*, **290**, 341-344.
- Tanaka-Takiguchi Y., Kinoshita M., Takiguchi K. (2009) Septin-mediated uniform bracing of phospholipid membranes. *Curr Biol*, **19**, 140-145.
- Tanford C. (1978) The hydrophobic effect and the organization of living matter. *Science*, **200**, 1012-1018.
- Tooley A. J., Gilden J., Jacobelli J., Beemiller P., Trimble W. S., Kinoshita M., Krummel M. F. (2009) Amoeboid T lymphocytes require the septin cytoskeleton for cortical integrity and persistent motility. *Nat Cell Biol*, **11**, 17-26.
- Tweten R. K. (2005) Cholesterol-dependent cytolysins, a family of versatile pore-forming toxins. *Infect Immun*, **73**, 6199-6209.
- Uchida C., Hattori T., Takahashi H., Yamamoto N., Kitagawa M., Taya Y. (2013) Interaction between RB protein and NuMA is required for proper alignment of spindle microtubules. *Genes Cells*.
- Vagin O., Tokhtaeva E., Garay P. E., Souda P., Bassilian S., Whitelegge J. P., Lewis R., Sachs G., Wheeler L., Aoki R., Fernandez-Salas E. (2014) Recruitment of septin cytoskeletal proteins by Botulinum toxin A protease determines its remarkable stability. *J Cell Sci*.
- Vale R. D. (1987) Intracellular transport using microtubule-based motors. *Annu Rev Cell Biol*, **3**, 347-378.
- van der Vaart B., Akhmanova A., Straube A. (2009) Regulation of microtubule dynamic instability. *Biochem Soc Trans*, **37**, 1007-1013.

- Viola A., Gupta N. (2007) Tether and trap: regulation of membrane-raft dynamics by actin-binding proteins. *Nat Rev Immunol*, **7**, 889-896.
- Wang D., Hiesinger P. R. (2013) The vesicular ATPase: a missing link between acidification and exocytosis. *J Cell Biol*, **203**, 171-173.
- Watanabe N., Madaule P., Reid T., Ishizaki T., Watanabe G., Kakizuka A., Saito Y., Nakao K., Jockusch B. M., Narumiya S. (1997) p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *Embo j*, **16**, 3044-3056.
- Wegner A., Aktories K. (1988) ADP-ribosylated actin caps the barbed ends of actin filaments. *J Biol Chem*, **263**, 13739-13742.
- Wigelsworth D. J., Ruthel G., Schnell L., Herrlich P., Blonder J., Veenstra T. D., Carman R. J., Wilkins T. D., Van Nhieu G. T., Pauillac S., Gibert M., Sauvonnnet N., Stiles B. G., Popoff M. R., Barth H. (2012) CD44 Promotes intoxication by the clostridial iota-family toxins. *PLoS One*, **7**, e51356.
- Wille M., Just I., Wegner A., Aktories K. (1992) ADP-ribosylation of gelsolin-actin complexes by clostridial toxins. *J Biol Chem*, **267**, 50-55.
- Wilson B. A., Reich K. A., Weinstein B. R., Collier R. J. (1990) Active-site mutations of diphtheria toxin: effects of replacing glutamic acid-148 with aspartic acid, glutamine, or serine. *Biochemistry*, **29**, 8643-8651.
- Wu X., Shen Q. T., Oristian D. S., Lu C. P., Zheng Q., Wang H. W., Fuchs E. (2011) Skin stem cells orchestrate directional migration by regulating microtubule-ACF7 connections through GSK3beta. *Cell*, **144**, 341-352.
- Wubbolts R., Leckie R. S., Veenhuizen P. T., Schwarzmann G., Mobius W., Hoernschemeyer J., Slot J. W., Geuze H. J., Stoorvogel W. (2003) Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J Biol Chem*, **278**, 10963-10972.
- Xie Y., Vessey J. P., Konecna A., Dahm R., Macchi P., Kiebler M. A. (2007) The GTP-binding protein Septin 7 is critical for dendrite branching and dendritic-spine morphology. *Curr Biol*, **17**, 1746-1751.
- Yaeger M., Funk N., Hoffman L. (2002) A survey of agents associated with neonatal diarrhea in Iowa swine including *Clostridium difficile* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Vet Diagn Invest*, **14**, 281-287.
- Yamamoto A. (2014) Gathering up meiotic telomeres: a novel function of the microtubule-organizing center. *Cell Mol Life Sci*.
- Yen F. T., Mann C. J., Guermani L. M., Hannouche N. F., Hubert N., Hornick C. A., Bordenau V. N., Agnani G., Bihain B. E. (1994) Identification of a lipolysis-stimulated receptor that is distinct from the LDL receptor and the LDL receptor-related protein. *Biochemistry*, **33**, 1172-1180.

Yen F. T., Masson M., Clossais-Besnard N., Andre P., Grosset J. M., Bougueleret L., Dumas J. B., Guerassimenko O., Bihain B. E. (1999) Molecular cloning of a lipolysis-stimulated remnant receptor expressed in the liver. *J Biol Chem*, **274**, 13390-13398.

Yoshihara K., Itaya A., Tanaka Y., Ohashi Y., Ito K., Teraoka H., Tsukada K., Matsukage A., Kamiya T. (1985) Inhibition of DNA polymerase alpha, DNA polymerase beta, terminal deoxynucleotidyl transferase, and DNA ligase II by poly(ADP-ribosyl)ation reaction in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, **128**, 61-67.

Young J. A., Collier R. J. (2007) Anthrax toxin: receptor binding, internalization, pore formation, and translocation. *Annu Rev Biochem*, **76**, 243-265.

Zhang J., Kong C., Xie H., McPherson P. S., Grinstein S., Trimble W. S. (1999) Phosphatidylinositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP. *Curr Biol*, **9**, 1458-1467.

9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

+TIP	<i>plus-end tracking protein</i>
°	Grad
°C	Grad Celsius
μ	mikro (1:1.000.000)
3D	dreidimensional
A	Adenin/Ampere
ACF7	<i>actin cross linking factor 7</i>
ADP	Adenindinukleotidphosphat
Arg	Arginin
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
<i>B. megaterium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
BamH	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H
Bgl	<i>Bacillus globigii</i>
bp	<i>base pairs</i>
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cytosin
<i>C. difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>
<i>C. perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>C. spiroforme</i>	<i>Clostridium spiroforme</i>
CD44	<i>clusters of differentiation 44</i>
cDNA	<i>copy deoxyribonucleic acid</i>
CDT	<i>Clostridium difficile</i> -Transferase
CDTa	Enzymatische Komponente von CDT
CDTb	Binde- und Translokations-Komponente von CDT
CGT	clostridiale glukosylierende Toxine
Ci	Curie ($3,7 \cdot 10^{10}$ Becquerel)
CLASP	<i>cytoplasmic linker protein associated protein</i>
CLIP	<i>cytoplasmic linker protein</i>
C-terminal	Carboxy-terminal
D	Asparaginsäure
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DIC	<i>differential interference contrast</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DTT	1,4-Dithiothreitol
E	Glutaminsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EB1/3	<i>endbinding protein 1/3</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence system</i>
EcoR	<i>Escherichia coli</i> RY13
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
F-Aktin	filamentöses Aktin
Fc	<i>fragment crystallizable</i>
FCF	Forchlorfenuron
fw	<i>forward</i>

G	Guanin
g	Gramm/Erdbeschleunigung
G-25	<i>gel type 25</i>
G-Aktin	globuläres Aktin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GM1	GM1-Gangliosid Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4(NeuAc α 2 \rightarrow 3)Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1Cer
GM3	GM3-Gangliosid NeuAc α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1Cer
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
h	Stunde/hekto (100)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hind	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd
HRP	<i>horseraddish peroxidase</i>
Hsp90	<i>heat shock protein 90</i>
IDA	<i>iminodiacetic acid</i>
IGEPAL	Octylphenoxypolyethoxyethanol
IgG	Immunoglobulin G
k	kilo (1000)
K	Lysin
l	Liter
lat.	lateinisch
LB	<i>lysogeny broth</i>
LSR	<i>lipolysis stimulated lipoprotein receptor</i>
m	milli/Meter
M	molar
m/V	Verhältnis Masse zu Volumen
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MDCK	Madin Darby <i>canine kidney</i>
MEM	<i>minimal essential media</i>
min	Minute
mol	Mol ($6,022 \cdot 10^{23}$ Moleküle)
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MβCD	Methyl- β -Cyclodextrin
n	nano (1:1.000.000.000)
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NTA	Nitrilotriessigsäure
N-terminal	Amino-terminal
NTPase	Nukleotidtriphosphatase
Ø	Durchmesser
OD	optische Dichte
PA	protektives Antigen
Pa	Pascal
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-polymerase
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PC	Phosphatidylcholin
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phosphatidylethanolamin
PEI	Polyethylenimin
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PIPES	Piperazin-N,N'-bis-(2-ethansulfonsäure)
PS	Phosphatidylserin
psi	<i>pound per square inch</i>

R	Arginin
Rab	<i>Ras-related in brain</i>
rev	<i>reverse</i>
RFP	<i>red fluorescent protein</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RU	<i>response units</i>
s	Sekunde
Sal	<i>Streptomyces albus G</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
SM	Sphingomyelin
SOC	<i>super optimal broth with catabolic repressor</i>
T	Thymin
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TcdA	<i>Clostridium difficile</i> Toxin A
TcdB	<i>Clostridium difficile</i> Toxin B
TcdC	Pathogenitätslokusgen
Thr	Threonin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>units</i>
UDP	Uridindiphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
V/V	Verhältnis Volumen zu Volumen
VIP	vegetatives insektizidales Protein
Xho	<i>Xanthomonas holcicola</i>

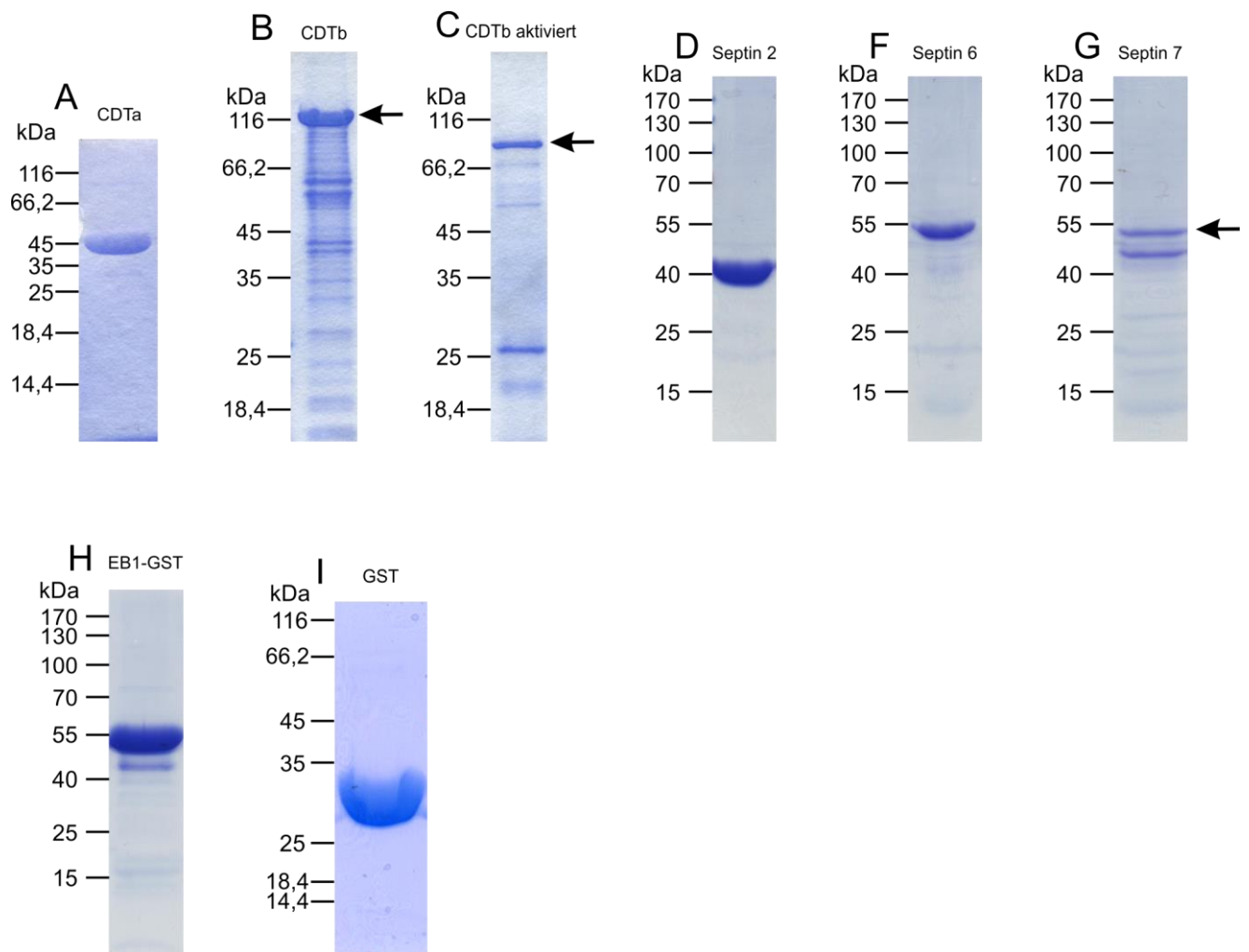


Abbildung 57: Coomassie-Färbungen von Acrylamidgelen, auf denen unterschiedliche Mengen der hier hergestellten und verwendeten Proteinpräparationen aufgetragen wurden. (A-I) Über den Gelspuren ist die jeweilige Bezeichnung des aufgetragenen rekombinanten Proteins angegeben. Links neben den Gelausschnitten sind die Positionen der Markerbanden des jeweils mitgeführten Proteinstandards angegeben. Die neben den Gelausschnitten B, C und G befindlichen Pfeile deuten auf das entsprechende rekombinante Protein.

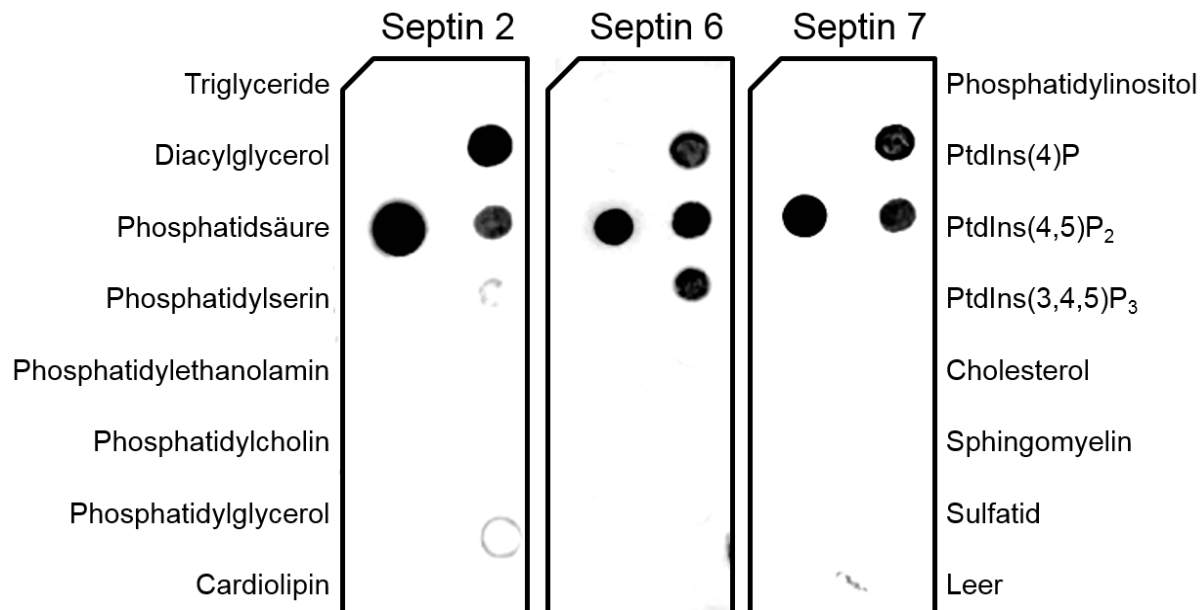


Abbildung 58: Bindung von rekombinanten Septinen an *membrane lipid strips*. Auf die *membrane lipid strips* wurden vom Hersteller (Echelon Biosciences Inc., Salt Lake City, UT, USA) verschiedene Membranlipide *gespottet*. Welche Lipide wo aufgetragen sind, geben die Beschriftungen links und rechts an. Die Membranen wurden bei Raumtemperatur für 30 min mit 1 % (m/V) BSA (Bovines Serumalbumin Fraktion V, fettsäurefrei, Roth) in TBS-T blockiert. Anschließend wurden die Membranen mit Lösungen der rekombinante Septine 2, 6 oder 7 (jeweils 200 ng/ml in Blockierlösung) über Nacht bei 4°C überschichtet. Anschließend wurden die Membranen 3-mal für 5 min mit TBS-T bei Raumtemperatur gewaschen und im Folgenden mit Antikörpern gegen das jeweilige Septin in der entsprechenden Verdünnung in Blockierlösung für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach anschließenden Waschschritten (3-mal 5 min) mit TBS-T bei Raumtemperatur wurden die Membranen mit Lösungen von HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur überschichtet. Die Membranen wurden 3-mal für 5 min bei Raumtemperatur mit TBS-T gewaschen. Nach einer 1-minütigen Inkubation mit einem 1:1 Gemisch aus ECL-1 und -2 wurden die Chemolumineszenzsignale der Membranen mit dem LAS-3000 mini Imaging System detektiert. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse von jeweils 2 Experimenten.

11. LEBENS LAUF

12. DANKSAGUNG

Zuerst möchte ich Herrn Prof. Dr. Hermann Ammer für die Vertretung der Arbeit vor der Fakultät und die ausgesprochen nette Kommunikation und Hilfestellung herzlichst danken.

Herrn Prof. Dr. Dr. Klaus Aktories danke ich für die schöne Zeit an seinem Institut und die tollen Bedingungen, die ich dort vorgefunden habe. Auch für die stetige Motivation und Unterstützung möchte ich Ihm herzlichst danken.

Den Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg danke ich für die tatkräftige Unterstützung, insbesondere Carsten, Elke, Anna, Antje, Alex, Vanda, Jürgen, Grazyna, Tatjana, Ute, Peter und Otti.

Dimi, Simon, Thomas, Sarah, Marianne und Yuri möchte ich für die schöne Zeit während, vor und nach der Arbeit danken.

Der größte Dank gilt meiner Familie und Farideh für die Unterstützung und die Liebe.

Danke sehr!